Quantitative Bestimmung von Androgenen im Plasma und Urin bei Patientinnen mit androgenbildenden Ovarialtumoren

Anton Hofer

1979

Dissertationsdruckanstalt Werner Blasaditsch · Augsburger Straße 8 · 8958 Füssen/Allgäu

Aus der I.Frauenklinik und Hebammenschule der
Universität München
Direktor: Prof.Dr. J.Zander

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ANDROGENEN IM PLASMA UND URIN BEI PATIENTINNEN MIT ANDROGENBILDENDEN OVARIALTUMOREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anton Hofer
aus
Gremheim/Dillingen
im Jahre
1979

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.H.MICKAN

Mitberichterstatter: Prof.Dr.J.ZANDER

Dekan: Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

M E I N E N E L T E R N

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr.med. J.Zander dafür danken,daß er mir die Arbeit an seiner Klinik ermöglichte.

Herrn Privatdozent Dr.med. H.Mickan spreche ich meinen Dank aus für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung beim Fortgang der Arbeit ebenso wie für die wissenschaftlichen Anleitungen und zahlreichen Ratschläge.

Herrn Privatdozent Dr.med. K.Lohe danke ich für die histologischen Untersuchungen der Operationspräparate.

Mein Dank auch Herrn Professor Dr.Dr. E.Kuss für die Bestimmung der 17-Ketosteroide.

Den Damen des Hormonlabors der I.Frauenklinik, Frau U.Rogowsky, Frau G.Trumm und Fräulein P.Fünfgelt, spreche ich meinen Dank aus für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit in der täglichen Praxis.

Nicht zuletzt gilt mein Dank all denen, die mir mit Rat und Tat hilfreich zur Seite standen, hier ganz besonders meiner Gattin, Frau Dr.med. E.Hofer.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG:	
	Androgene: Biosynthese, Wirkung, Ausscheidung	1
	Androgenbildende Ovarialtumoren: Einteilung Differentialdiagnose	11
	Klin. Diagnostik, Fragestellung	12
II.	MATERIAL UND METHODIK:	15
II.A.	Biologisches Material u. Patientengut	15
II.B.	Reagenzien	16
II.C.	Chromatographien	18
II.D.	Extraktion und Reinigung	30
II.E.	Reaktionen und Derivatbildung	34
II.F.	Quantitative Bestimmung	37
II.G.	Prüfung der Methode, Identifizierung	41
III.	KASUISTIK:	43
III.A.	Klinische Beschreibung der Fälle, Anamnese, Befunde, Therapie, Histologie	43
III.B.	Ergebnisse der Plasma- und Urinuntersuchungen	67
IV.	DISKUSSION:	76
V.	ZUSAMMENFASSUNG:	94
VI.	LITERATURVERZEICHNIS:	98

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ANDROGENEN IM PLASMA UND URIN BEI PATIENTINNEN MIT ANDROGENBILDENDEN OVARIALTUMOREN

I. EINLEITUNG

Androgenproduzierende Ovarialtumoren sind selten. Zusammen mit den östrogenbildenden Eierstocks - tumoren bilden sie die Gruppe der differenzierten Keimdrüsenstroma-Tumoren,deren Häufigkeit von JANOVSKI (1973) mit 3-5 % aller primären Ovarial-tumoren angegeben wird.

Bei aller Seltenheit der androgenbildenden Tumoren darf man nicht vergessen,wie sehr im Einzelfall die äußeren Symptome wie Hirsutismus+ und Virilismus+ das Selbstwertgefühl der Frau verletzen können,mehr noch als die viel häufigeren Bilder der Hypertrichosis+ und des "familiären Hirsutismus", die ihrerseits schon von einer Frau als störend,und ihrer Weiblichkeit abträglich empfunden werden.Gelegentlich resultieren daraus neurotische bis psychotische Symptome wie Depressionen und Minderwertigkeitsgefühle.

+ Hypertrichosis : vermehrte allgemeine,aber typisch feminine Körperbehaarung.

+ Hirsutismus : vermehrte Körperbehaarung an bestimmten Stellen wie Oberlippe, Kinn,Linea alba,(=typ.männlich).

+ Virilismus : Hirsutismus + Klitorishypertrophie, tiefe Stimme,Oligo-Amenorrhoe,Akne, Mamma-Atrophie,männl.Habitus.

In diesem Zusammenhang tauchen Fragen nach dem Sinn männlicher Hormone in einem weiblichen Organismus, und nach der Ursache von Hirsutismus und Virilismus auf. Abbildung 1 nennt Ursachen nach exogener, adrenaler und ovarieller Herkunft der Androgene :

ÄTIOLOGIE VIRILISIERENDER SYNDROME BEI DER FRAU

EXOGEN	ADRENAL	OVARIELL
SYNTHET. GESTAGENE	AGS	PCO (STEIN-LEVENTHAL)
ANDROGENE	HYPERPLASIE	STROMAHYPERPLASIE
ANABOLIKA	ADENOM	TUMOREN
	CARCINOM	CARCINOM

Abb. 1 : Ätiologie virilisierender Syndrome bei der Frau.

Androgene sind C-19-Steroide, die keine Seitenkette wie Progesteron besitzen. Die biologischen Aktivitäten der natürlichen Androgene sind in der Regel an eine Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 oder zwischen C-5 und C-6, oder an eine Transverbindung der Ringe A und B (H in α-Stellung an C-5) gebunden. Das Ausmaß der Aktivität dagegen ist vom Substituenten an C-3 und C-17 abhängig (LABHART, 1971).

Die Hauptquelle der Androgene der gesunden Frau ist die Nebennierenrinde, die vor allem DHEA-Sulfat bildet (Abb.4). Die Hiluszellen und das Stroma des normalen Ovars synthetisieren hauptsächlich Testosteron und Androstendion, die Follikel vor allem DHEA.

Bei der Biosynthese der Androgene werden zwei verschiedene Wege beschritten (Abb. 2) :

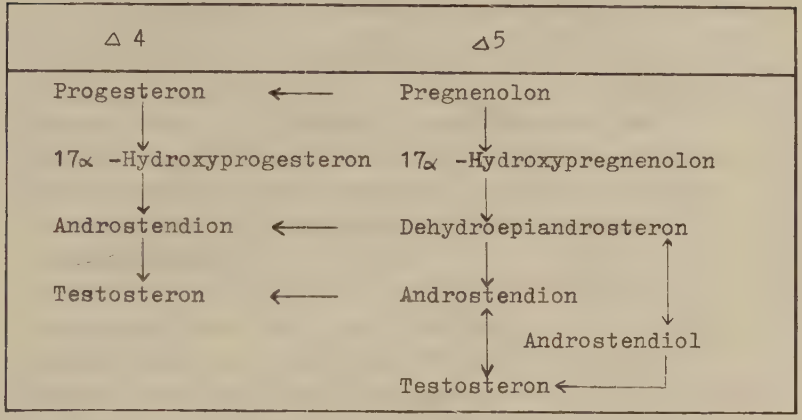

Abb. 2 : Δ4- und Δ5-Weg der Androgen-Biosynthese

Der sogenannte "Δ5-Weg" führt vom Pregnenolon über 17-OH-Pregnenolon und DHEA zum Androstendion,und wird vor allem in der Follikelphase des weiblichen Zyklus, beim Syndrom des polycystischen Ovars (PCO), und bei der Steroidsynthese während des Fetallebens postuliert.

Der "Δ4-Weg" hingegen wird vorwiegend im Corpus luteum, in den Hiluszellen und im Stroma des Ovars beschritten. Er verläuft folgendermaßen: Progesteron → 17-OH-Progesteron → Androstendion → Testosteron (JUNKMANN,1960; ZANDER,1963).

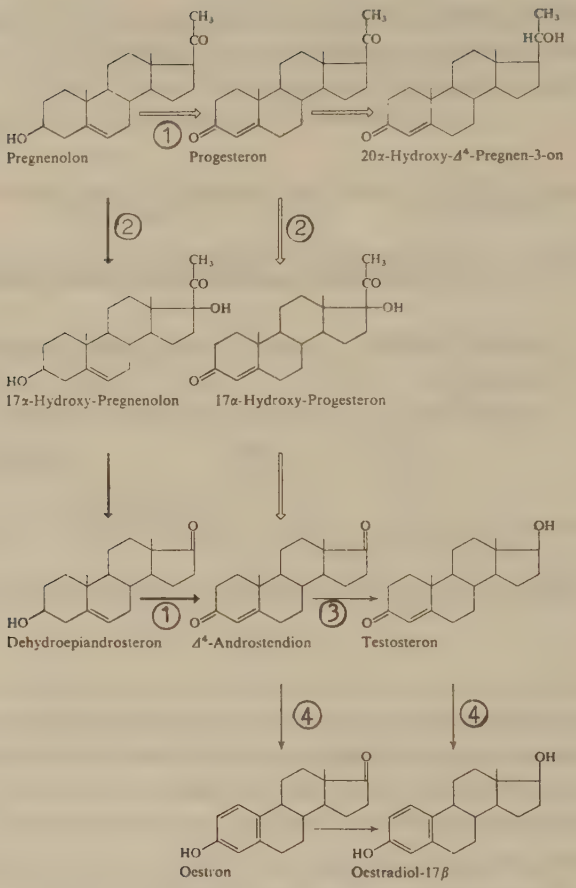

Abb. 3 : Biosynthese der Ovarialsteroide (SMITH,1962)

⇓ △ 4-Weg : Corpus luteum,Hilus u.Stroma ovarii

↓ △ 5-Weg : Follikel,Fetus,PCO

① △5-△4-Isomerase
3β-ol-Dehydrogenase

② 17α-Hydroxylase

③ 17-Dehydrogenase

④ 3β-ol-Dehydrogenase,Aromatisierung

Von den bis jetzt bekannten menschlichen Androgenen ist Testosteron das wichtigste androgene Hormon, dessen biologische Aktivität nur vom Dihydrotestosteron übertroffen wird. Es wird im Ovar und in der NNR gebildet (Abb. 5).
Im Plasma wird Testosteron ebenso wie Oestradiol und Dihydrotestosteron (= Steroide mit 17ß-Hydroxylgruppe) durch ein spezifisches ß-Globulin, das "Sex Hormone Binding Globuline" (SHBG) transportiert, an das es so stark gebunden ist, daß nur 1 % des Testosterons in freier Form im Plasma vorkommt (VERMEULEN, 1972).
VERMEULEN (1972) führt Hirsutismus auf niedrige Konzentrationen von Serum-SHBG zurück, so daß mehr ungebundenes Testosteron im Serum sich befindet. Oestrogene stimulieren, Androgene hemmen die Bildung des SHBG in der Leber.
BAIRD et al. (1969) wiesen nach, daß bei der gesunden Frau ungefähr 50 - 70 % der täglichen Testosteronproduktion aus der Umwandlung von Androstendion stammen, während nur etwa 15 % aus DHEA gebildet werden.
Die Aktivität von Androstendion, DHEA, Androsteron und Androstandiol ist 5 - 20 mal geringer als diejenige von Testosteron (LABHART, 1971).

Intrazellulär wird Testosteron durch die 5α-Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt (Abb. 4).

Testosteron
17ß-Hydroxyandrost-4-en-3-on

5α-Dihydrotestosteron
= 17ß-Hydroxy-5α-androstan-3-on

Abb. 4 : Umwandlung von Testosteron zu Dihydrotestosteron durch die 5α-Reduktase

Nach BRUCHOVSKY (1968) und WILSON (1969) ist diese Metabolisierung im Erfolgsorgan eine Voraussetzung für die biologische Wirksamkeit von Testosteron. DHT ist noch stärker als Testosteron an das SHBG gebunden. DHT-spezifische Rezeptoren wurden in den Zellkernen der Prostata nachgewiesen (ANDERSON, 1968). LIPSETT (1973) unterstreicht die Bedeutung des Dihydrotestosterons, indem er die testikuläre Feminisierung auf eine Insuffizienz der 5α-Reduktase zurückführt, und den idiopathischen Hirsutismus als Folge einer erhöhten Metabolisierung von DHT durch die Haarfollikel bei normalem Androgenspiegel ansieht.

Androstendion besitzt nach JANOVSKI (1973) nur 12 % der androgenen Aktivität des Testosterons. Es ist jedoch quantitativ als Prähormon von großer Bedeutung, da es schnell und überall im Körper durch Reduktion in Testosteron umgewandelt werden kann.
Es wird zu gleichen Teilen im Ovar und in der Nebennierenrinde gebildet, jedoch nicht in der Peripherie aus Prähormonen (OSBORN, 1971; SIITERI, 1971). Erhöhte Androstendionproduktion von seiten des Ovars findet man bei den meisten Patientinnen mit Hirsutismus (KIRSCHNER, 1971), verstärkte Sekretion von seiten der Nebennierenrinde bei der angeborenen NNR-Hyperplasie.

Androstendion spielt offensichtlich bei der gesunden Frau eine größere Rolle als Testosteron:
Bei beiden Geschlechtern ist vor der Pubertät die Relation Testosteron : Androstendion nicht sehr verschieden, und beträgt etwa 0,5 : 1. Während bei erwachsenen Männern der Plasmatestosteronwert um fast das 17-fache ansteigt, ändert sich der Androstendionspiegel nicht wesentlich.

Bei der Frau dagegen steigt nach der Pubertät die Plasmakonzentration von Androstendion stärker an als die von Testosteron bei gleichem obigen präpuberalen Verhältnis von 0,5 : 1 (FRASIER, 1966). Diese Tatsache verdeutlicht uns die enorme Bedeutung des Androstendions als Prähormon für die Oestrogenproduktion bei der Frau (Abb. 3). Eine pathologische Vermehrung der Androgene im Organismus der Frau ließe sich somit durch Rückstauung infolge Insuffizienz der 3ß-ol-Dehydrogenase oder der aromatisierenden Enzyme erklären (HENI,KLAUS,1977).

Die Bedeutung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) unter den Androgenen ist noch umstritten,seine androgene Aktivität ist gering.
Im Blut wird es jedoch in relativ großen Mengen,vor allem als DHEA-Sulfat gefunden,und kommt als potentielle Vorstufe von Testosteron in Frage (Abb.5 u.7).

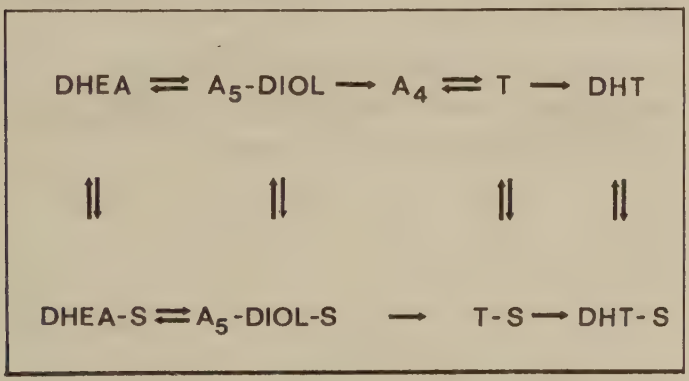

Abb. 5 : Androgene im peripheren Blut

...-S = sulfokonjugierte Form des Androgens
A_5-diol = Androstendiol
A_4 = Androstendion
T = Testosteron
DHT = Dihydrotestosteron

HENI und KLAUS (1977) fanden bei Patientinnen mit idiopathischem Hirsutismus eine eindeutige Vermehrung von DHEA, die sie auf einen partiellen Defekt der 3ß-ol-Dehydrogenase zurückführen: Das nicht in Progesteron umgewandelte Pregnenolon wird auf dem $\Delta 5$-Wege in DHEA und seine Derivate umgewandelt.

In der Gravidität dient mütterliches und fetales DHEA-Sulfat als wichtiger Baustoff für die großen Mengen plazentarer Oestrogene: DHEA-Sulfat → 16α-OH-DHEA-Sulfat → Androstentriol-Sulfat → Sulfatabspaltung durch plazentare Sulfatase → Oestriol (BAULIEU, 1965).
Das fetale DHEA-Sulfat ist ein wesentliches Prähormon für plazentares Progesteron (EBERLEIN, 1965).

Etiocholanolon besitzt keinerlei androgene Aktivität, und führt zu Fieber und Leukozytose, wenn es in freier Form intramuskulär injiziert wird (DORFMANN, 1956).

Androsteron senkt den Cholesterin-, Phospholipid- und Triglyceridspiegel im Plasma.

STEROID	AKTIVITÄT in %	URSPRUNG	TÄGLICHE PRODUKTIONSRATE	KONZENTRATION IM PLASMA	REFERENZ
Testosteron	100	Ovar 5-20 % NNR 0-30 % peripher aus : Androstendion 50-70% DHEA 15 %	230 µg/Tag	0,2-0,8 ng/ml	BARDIN,1967 ROSENFIELD,1971
Dihydrotestosteron	125-300	peripher aus : Androstendion 85 % Testosteron 15 %	75 µg/Tag	0,05-0,3 ng/ml	ITO,HORTON,1970 BARDIN,LIPSETT, 1971
Δ4-Androstendion	10-20	Ovar 50 % NNR 50 %	3400 µg/Tag	1,1-3,2 ng/ml	HORTON,1966 BAIRD,1974
Dehydroepiandrosteron	5-10	Ovar 20 % NNR 80 %	700 µg/Tag	2,6-5,8 ng/ml	ABRAHAM,1975 GOLD,1975
DHEA-Sulfat	0	Ovar 10 % NNR 90 %	7700 µg/Tag	1300-2100 ng/ml	ABRAHAM,1974

Abb. 6 : Übersicht über die wichtigsten androgenen Steroide bei der Frau

Die wesentlichen Ausscheidungsprodukte der Androgene sind Androsteron, Etiocholanolon, Androstandiol und DHEA, die den Hauptanteil der 17-Ketosteroide des Urins bilden.
Die normale Ausscheidung der 17-Ketosteroide liegt bei der Frau zwischen 7 und 15 mg pro Tag. 1/3 davon stammen aus dem Ovar, die restlichen 2/3 aus der NNR. Der Vorläufer der wichtigsten 17-Ketosteroide Androsteron und Etiocholanolon ist Androstendion, das in der Leber aus Testosteron und DHEA synthetisiert wird. Allerdings kann selbst eine stark erhöhte Testosteronsynthese des Ovars durch die Bestimmung der 17-KS nicht erfaßt werden, da Testosteron nur zum geringsten Teil als 17-KS im Urin ausgeschieden wird (DORFMANN, 1965).

Da DHEA und etwa 50 % des Androstendions von der NNR sezerniert werden, ist die 17-Ketosteroidausscheidung ein Parameter für die NNR-Aktivität.

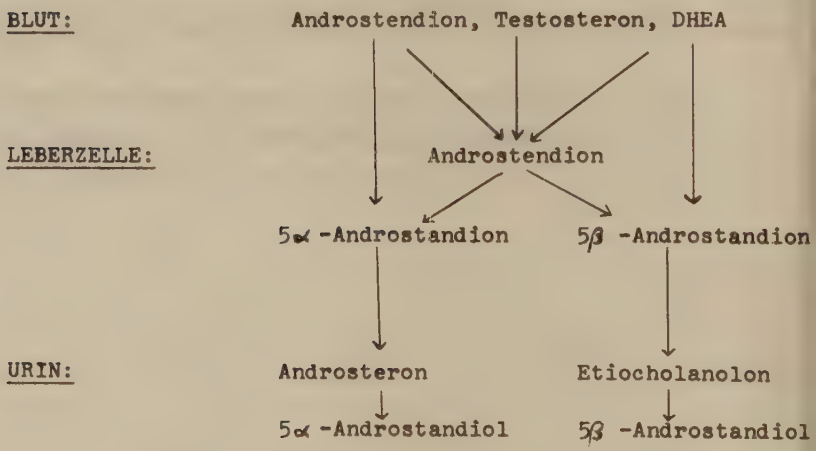

Abb. 7 : Abbau und Ausscheidung der Androgene

Einteilung der funktionellen Ovarialtumoren :

Die Einteilung der funktionellen Ovarialtumoren erfolgt nach morphologischen Kriterien, ihre endokrine Aktivität wird noch nicht als Grundlage einer Klassifikation herangezogen.
SCULLY (1963) teilt die androgenen Störungen und Veränderungen des Ovars in Neubildungen im eigentlichen Sinne und in Hyperplasien ein :

I. NEUBILDUNGEN

1. Tumoren vom männlichen Zelltyp
   a. Sertoli-Leydigzelltumor (Androblastom)
   b. Leydigzelltumor (Hiluszelltumor)
2. Lipoidzelltumor (Adrenaler Resttumor)
3. Tumoren vom weiblichen Zelltyp
   a. Granulosa-Thecazelltumor
   b. Thecazelltumor
4. Gynandroblastome
5. Gonadoblastome (gemischtzellige Germinome)
6. Benigne und maligne Tumoren mit endokriner Aktivität des Stromas

II. HYPERPLASIEN

1. Polycystisches Ovar (Stein-Leventhal-Syndrom)
2. Hyperthecosis (Luteinisierung des ovariellen Stromas)
3. Hiluszellhyperplasie

Klinische Diagnostik :

Die klinische Diagnostik von Hirsutismus und Virilisierungserscheinungen beginnt mit der gynäkologischen Untersuchung. Ist der hierbei erhobene Befund unauffällig, sollte eine Beteiligung der Nebennierenrinde ausgeschlossen werden: Die Bestimmung der 17-Ketosteroide im Urin ergibt trotz geringer Spezifität der Methode beim Vorliegen eines adrenalen Prozesses meist erhöhte Werte. Hormonaktive Tumoren der Ovarien verursachen dagegen nur selten eine erhöhte 17-Ketosteroid-Ausscheidung.

Weiterführende Informationen liefert der kombinierte Dexamethason-HCG-Test: Durch 5-tägige orale Gabe von 4 mg Dexamethason wird die Ausschüttung von ACTH gebremst. Wenn die 17-Ketosteroide, bzw. die während des Testes untersuchten Androgene nicht absinken (= negativer Dexamethasontest), besteht Verdacht auf einen funktionell autonomen Prozess der NNR (Adenom,Carcinom),dessen weitere Abklärung erforderlich ist.

Gelingt hingegen die Suppression der 17-Ketosteroide und Androgene (= positiver Dexamethasontest),muß geklärt werden,ob die Androgene aus dem Ovar oder der Nebennierenrinde stammen.Dies erfolgt mit dem kombinierten Dexamethasonsuppressions - HCG-Stimulations - Test: Während die NNR-Funktion weiter durch Dexamethason gebremst wird, erfolgt durch HCG eine Stimulation der ovariellen Steroidsynthese. Steigt die 17-Ketosteroid-Ausscheidung während dieser diagnostischen Maßnahme an,muß angenommen werden,daß diese in pathologisch veränderten Ovarien gebildet werden.

Wenn mit diesen Methoden keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann, bieten sich röntgenologische Verfahren wie Angiographie, i.v.Pyelogramm oder retroperitoneale Luftfüllung zum Ausschluß eines Nebennierenrinden-Tumors an.

Mittels der technisch sehr difficilen Katheterisierung der Vv. suprarenales und Vv.ovaricae läßt sich anhand der Hormonkonzentrationen in den selektiv entnommenen Blutproben ein endokrin aktiver Prozess häufig lokalisieren.

Abbildung 8 zeigt die einzelnen Schritte bei der klinischen Abklärung von Hirsutismus und Virilisierung:

GYNÄKOLOGISCHE UNTERSUCHUNG
HORMONANALYSEN (17-KS, A, T)
DEXAMETHASON - HCG - ACTH - TEST
i.v. UROGRAPHIE
NNR - ANGIOGRAPHIE (arteriell)
SELEKTIVE VENOGRAPHIE MIT BLUTENTNAHME
RETROPNEUMOPERITONEUM
LAPAROSKOPIE
LAPAROTOMIE

Abb. 8 : Diagnostik bei Hirsutismus und Virilisierung

Neuerdings bieten sich zur Diagnose von adrenalen und ovariellen Tumoren auch das Ultraschall-Verfahren und die Computertomographie an.

In der vorliegenden Studie befassen wir uns anhand von neun Patientinnen,die mit dem Verdacht auf einen androgenproduzierenden Tumor in die Klinik kamen,mit folgenden Fragen :

- Sind die verschiedenen Arten von androgen-produzierenden Tumoren jeweils durch bestimmte Androgene charakterisiert ?

- Variiert bei gleichem histologischen Befund die Qualität und Quantität der Androgene ?

- Welche sind die funktionellen,morphologischen und histologischen Charakteristika der in der Pubertät, im Fertilitätsalter und in der Menopause auftretenden Tumoren ?

- Werden Hirsutismus und Virilismus durch Qualität oder Quantität bestimmter Androgene verursacht ?

II. MATERIAL UND METHODIK

II.A. Biologisches Material und Patientengut

Untersucht wurden Plasma und Urin der neun Patientinnen. Hierzu wurde jeweils Blut vor und während des kombinierten Dexamethason-HCG-Testes , sowie nach der Operation aus einer Vene in der Armbeuge entnommen.
Nach Abtrennung des Plasmas durch Zentrifugation wurde es im Labor bei -20°C tiefgefroren und bei dieser Temperatur bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

Vor der Operation wurde zur Bestimmung der 17-Ketosteroid-Ausscheidung 24-Stunden-Urin gesammelt. Die Menge wurde festgestellt,und anschließend bei -20°C bis zur Bestimmung der 17-Ketosteroide und Untersuchung der Androgene aufbewahrt.
Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie im methodischen Teil beschrieben.

II.B. Reagenzien :

II.B.1 Alle benützten organischen Lösungsmittel hatten analytischen Reinheitsgrad (MERCK).

AMBERLITE XAD-2 p.a. (SERVA,Heidelberg)
ALUMINIUMOXID-NEUTRAL (WOELM,Eschwege)
CELITE Partikelgröße 10-40(SERVA,Heidelberg)
CRÈPY-REAGENZ: (250 mg Methylenblau,50 g Na_2SO_4, 10 ml H_2SO_4conc.ad 1000ml aqua dest) wurde als Vorratslösung aufbewahrt und vor Gebrauch mit aqua dest.1:1 verdünnt.(CRÈPY,RULLEAU-MESLIN,1960)
GAS-CHROM Q (SERVA,Heidelberg)
HFN = HEXADECAFLUORNANOYLCHLORID (PCR.INC. Gainesville,Florida)
KETODASE (General Diagnostics,Morris Plains,N.J.)
KIESELGEL GF 254 nach Stahl (MERCK)
SEPHADEX LH-20 (PHARMACIA FINE CHEMICALS,Uppsala)
TLC-ALU-FOLIEN Kieselgel 60 F 254 (MERCK)
TLC-SPRAY : 0,5 ml Anisaldehyd,5 ml H_2SO_4 conc., 50 ml Essigsäure
PYRIDIN (MERCK) wurde vor Gebrauch über Aluminiumoxid getrocknet

II.B.2 Steroide:

Die nicht radioaktiv markierten Steroide wurden von MERCK bezogen,außer ANDROSTERON,ETIOCHOLANOLON und 5α-DIHYDROTESTOSTERON,die von SERVA INTERNATIONAL stammten.

Abkürzung:	Trivialname:	Systematischer Name(IUPAC):
A	ANDROSTERON	3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on
Eti	ETIOCHOLANOLON	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on
Aa	ANDROSTANDIOL	5α-Androstan-3α,17ß-diol
Ae	ANDROSTENDION	4-Androsten-3,17-dion
DHT	DIHYDRO-TESTOSTERON	17ß-Hydroxy-5α-androstan-3-on
DHEA	DEHYDROEPI-ANDROSTERON	3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on
T	TESTOSTERON	17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on
P	PROGESTERON	4-Pregnen-3,20-dion

II.B.3 Radioaktiv markierte Steroide:

Folgende radioaktiv markierten Substanzen wurden von RADIOCHEMICAL-Center,Amersham,bezogen:

($1,2\text{-}^{3}H$)-5α-ANDROSTANDIOL (Spez.Akt.41 Ci/mmol)
(^{3}H)-ANDROSTENDION (80 Ci/mmol)
(^{3}H)-DIHYDROTESTOSTERON (55 Ci/mmol)
(^{3}H)-DEHYDROEPIANDROSTERON (22 Ci/mmol)
(^{14}C)-PROGESTERON (60 mCi/mmol)
($7\alpha\text{-}^{3}H$)-PROGESTERON (58 Ci/mmol)
($4\text{-}^{14}C$)-TESTOSTERON (49 mCi/mmol)
($7\alpha\text{-}^{3}H$)-TESTOSTERON (87 Ci/mmol)

Von NEW ENGLAND NUCLEAR (Dreieichenhain) stammten folgende markierten Steroide:

(^{3}H)-ANDROSTERON (40-60 Ci/mmol)
(^{3}H)-ETIOCHOLANOLON (40-60 Ci/mmol)
($7(n)\text{-}^{3}H$)-DHEA-SULFAT (10-25 Ci/mmol)

Sämtliche radioaktiv markierten Steroide wurden für die Identifizierung und quantitative Bestimmung vor Gebrauch durch geeignete TLC-Systeme (Tab.1) gereinigt.

II.C. Chromatographien :

II.C.1 Papierchromatographie (PC) :

Bei der Papierchromatographie wurde als Träger der stationären Phase Cellulose in Form von Spezialfilterpapieren verwendet.
Zur chromatographischen Trennung der Steroide wurde die gelöste Probe punktförmig etwa 3cm vom unteren Rand des 30 cm langen "Fließpapieres" aufgetragen. Die Papiere wurden dann in geschlossenen Kammern zur "Entwicklung" in das Fließmittelgemisch

n-Hexan:Methanol:H_2O = 100:65:35

eingehängt. Anschließend wurden die R_f-Werte der getrennten Androgene errechnet:

$$R_f = \frac{\text{Entfernung Startpunkt-Fleckmittelpunkt}}{\text{Entfernung Startpunkt-Fließmittelfront}}$$

Folgende R_f-Werte (ratio to front) wurden ermittelt:

Δ5-Androstendiol	R_f:	0,22
5α-Androstandion		0,71
5ß-Androstandion		0,70
Δ4-Androstendion		0,39
DHEA		0,29
DHT		0,30
Testosteron		0,21

II.C.2 Dünnschichtchromatographie (TLC) :

Die TLC-Platten wurden selbst hergestellt indem 20 x 20 cm große Glasplatten mit Methanol gereinigt, und anschließend mit einer 0,25 mm dicken Schicht "Kieselgel GF 254 nach Stahl" überzogen wurden.
Nach dem Trocknen wurden die Platten mit Methanol gewaschen, und vor Gebrauch bei 110° C eine Stunde im Trockenschrank aktiviert.
Die zu trennenden Steroide wurden etwa 2 cm über dem unteren Plattenrand aufgetragen.
Nach Entwicklung der Platten (Systeme s.Tab.1) wurden die getrennten Substanzen auf der TLC-Platte mittels UV-Licht und Anisaldehyd-Schwefelsäure-Spray durch 10-minütiges Erhitzen auf 100° C dargestellt.
Die Verteilung radioaktiv markierter Substanzen wurde mit einem TLC-Scanner mit x-y-Schreiber (BERTHOLD FRIESEKE Mod.LB 2723) lokalisiert.

Tabelle 1 zeigt die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Lösungsmittelsysteme :

HFN-Derivate	System I	II	III	IV
5α-Androstandiol	R_f: 0,85	0,61	0,68	0,42
Androsteron	R_f: 0,57	0,32	0,40	0,36
Etiocholanolon	R_f: 0,58	0,37	0,44	0,38
DHEA	R_f: 0,55	0,28	0,36	0,34
DHT	R_f: 0,43	0,25	0,31	0,31
Testosteron	R_f: 0,28	0,14	0,17	0,20

	System V	VI	VII	VIII
5α-Androstandiol	R_f: 0,36	0,55	0,33	0,28
Δ5-Androstendiol	R_f: 0,36	0,60	0,33	0,29
5α-Androstandion	R_f: 0,77	0,82	0,86	0,62
5ß-Androstandion	R_f: 0,77	0,84	0,86	0,58
Δ4-Androstendion	R_f: 0,61	0,73	0,80	0,56
Androsteron	R_f: ----	----	0,48	----
Etiocholanolon	R_f: ----	----	0,53	----
DHEA	R_f: 0,55	0,68	0,61	0,43
DHT	R_f: 0,55	0,76	0,61	0,40
Testosteron	R_f: 0,36	0,55	0,50	0,23

System I = n-Hexan:Essigester = 80:20
System II = n-Heptan:Essigester = 80:20
System III = Cyclohexan:Essigester = 80:20
System IV = n-Heptan:Aceton = 80:20
System V = Benzol:Essigester = 2:1
System VI = Diäthyläther:Benzol = 9:1
System VII = Chloroform:Aceton = 9:1
System VIII = n-Hexan:Essigester = 3:1
3 x entwickeln

Tab. 1 : R_f-Werte der einzelnen Androgene bei den verschiedenen Lösungsmittelsystemen

II.C.3 Säulenchromatographie :

II.C.3a Sephadex LH-20 -Säulenchromatographie :

Zur Trennung der "freien Steroide" von den "sulfokonjugierten Steroiden" wurde eine ca. 15 cm lange Sephadex LH-20 - Säule mit 1 cm Innendurchmesser benützt, bei Verwendung des Lösungsmittelsystems Chloroform:Methanol = = 1:1 (v/v) in 0,01 molarem NaCl.
Das verwendete Sephadex mußte vor Gebrauch mindestens 24 h in diesem System bei Raumtemperatur quellen,und wurde dann mit einer Pipette in die Glassäule gegeben.
Zur besseren Äquilibrierung der Sephadex-Säule folgten 20 ml des Lösungsmittelsystems.
Schließlich wurde in 5 x 0,4 ml-Portionen die Plasmaprobe auf die Säule aufgetragen.
Mit 16 ml des Lösungsmittelsystems wurden die "freien Steroide" eluiert,anschließend mit ebenfalls 16 ml die sulfokonjugierten Steroide ="Sulfate",die dann über Nacht solvolysiert wurden (SETCHELL,1973).

Abbildung 9 zeigt die Trennung der "freien Steroide" von den "Sulfaten" durch die Sephadex LH-20 - Säulenchromatographie.

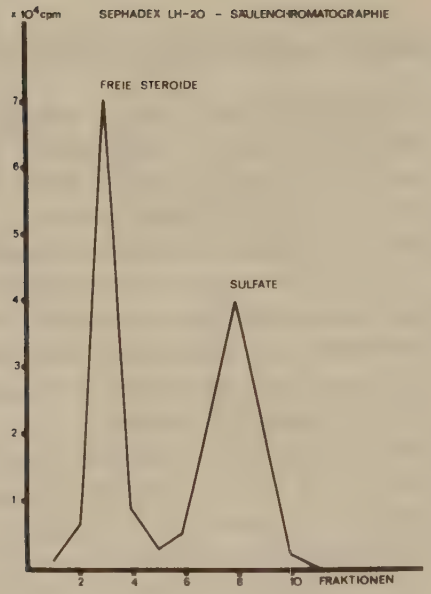

Abb. 9 : Elutionsmuster der Säulenchromatographie auf Sephadex LH-20

II.C.3b Aluminiumoxid-Säulenchromatographie :

Die Aluminiumoxid-Säule diente der Abtrennung von Progesteron und Androstendion von den stärker polaren Androgenen DHEA, DHT, Testosteron und Androstandiol.
Das hierzu verwendete Aluminiumoxid wurde mit 3 % H_2O versetzt.

Nach zwei Stunden Quellung wurde es anschließend im Elutionssystem Cyclohexan:Benzol = 1:1 plus 5 % Äthylacetat über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt.Nach diesem Quellungsvorgang wurde es in eine 10 cm hohe Glassäule mit 7 mm Innendurchmesser gefüllt.Mit 10 ml des Systems wurde die Säule äquilibriert.

Die Fraktion der "freien Steroide" aus der Sephadex LH-2o-Säulenchromatographie wurde in 5 x 0,2 ml-Portionen aufgetragen.Es folgten 10 ml des Elutionssystems Cyclohexan:Benzol = 1:1 plus 5 % Äthylacetat. Anschließend wurde mit 30 ml des Systems Cyclohexan:Benzol = 1:1 plus 12 % Äthylacetat die Progesteron-Androstendion-Fraktion eluiert.
Nach weiteren 30 ml des Systems Benzol:Äthylacetat = 1:1 wurden DHEA,DHT,Testosteron und Androstandiol eluiert.

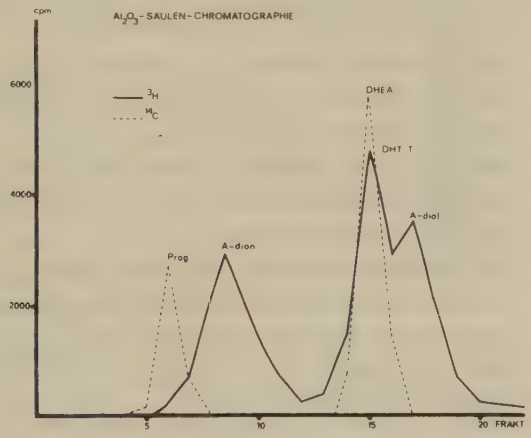

Abb. 10 : Elutionsmuster der Aluminiumoxid-Säule Modifikation der von I.R.SENCIALL (1973) beschriebenen Aluminiumoxid-Säulenchromatographie

II.C.3c Celit-Gradienten-Säulenchromatographie :

Zur Auftrennung der Androgene im Urin wurde die modifizierte Gradientensäule nach SIITERI benützt,wie von SCHINDLER (1972) beschrieben.

Der verwendete Celit wurde vor Gebrauch in eine 90 cm lange Glassäule mit 3 cm Innendurchmesser gepackt,und wie folgt gewaschen :
1 Liter 6-normale HCl wurde auf die Säule gegeben.Anschließend wurde mit Aqua dest. bis zur Neutralität nachgespült.Es folgten 500-700 ml Methanol und 500 ml Diäthyläther. Zuletzt wurde der Celit mittels Wasserstrahlpumpe durch Luft getrocknet.

Die Gradientensäule mit 2 cm Innendurchmesser wurde wie folgt gepackt :

Der unterste Abschnitt der Säule (C) bestand aus 10 g Celit,der mit 5 ml Aqua dest. vermengt wurde.
Darauf (B) wurden in kleinen Portionen 30 g Celit gepackt,der mit 15 ml Äthylenglykol vermischt war.
Der Extrakt aus der Urinprobe wurde in 2 ml Äthylenglykol aufgelöst,mit 4 g Celit vermischt,und als oberste Schicht (A) auf die Säule gegeben.

Die anschließende Elution wurde auf folgende Weise durchgeführt :
Zuerst wurden 100 ml Isooctan in Zylinder I (siehe Abb. 11) gefüllt,die vollständig über die Säule liefen,wobei das "Hold-Back-Volumen" der Säule festgestellt wurde.

In Zylinder I folgten dann 200 ml Isooctan und in Zylinder II 200 ml des Gemisches Isooctan : Äthylacetat = 7 : 3 .

Abbildung 12 zeigt das Elutionsmuster der Celit-Gradientensäule.

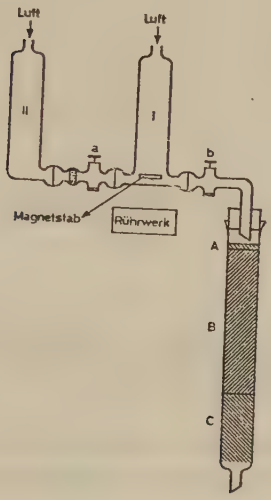

Abb. 11 : Apparatur der Celit-Gradientensäulen-Chromatographie

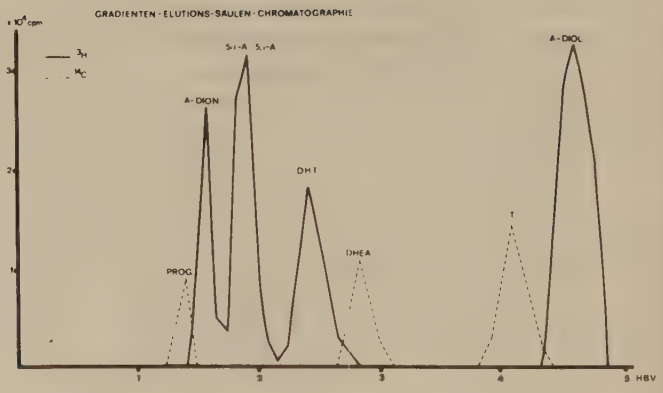

Abb. 12 : Elutionsmuster der Celit-Gradientensäule

II.C.3d Triäthylammoniumsulfat-Celit-Säulenchromatographie :

Diese Säule diente der Trennung einzelner Steroidsulfate. Das Elutionssystem setzte sich aus folgenden Lösungsmitteln zusammen:

Isooctan:Benzol:Äthylmethylketon:Methanol: 0,2 molares Triäthylammoniumsulfat = 2:4:2:2:3 (MICKAN et al.,1969).
20 g Celit wurden mit 10 ml der stationären Phase des Lösungsmittelgemischs, und die Steroid-Sulfatprobe mit 1 ml der stationären Phase gemischt.

II.C.4 Gaschromatographie(GLC) :

Die Gaschromatographie diente der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Androgenen in Extrakten aus Blutplasma und Urin.

Die Ausführung der Gaschromatographie erfolgte auf einem PACKARD-Gaschromatographen Serie 7400 (Doppel-ECD, ^{63}Ni-Folie) mit einer 3 % (stationäre Phase) QF-1-Säule von 1,7 m Länge und 2,5 mm Innendurchmesser.
Die Säulen wurden vor Gebrauch siliconisiert (Siliconlösung SERVA).

Es wurden folgende Betriebsbedingungen gewählt :

Einlaß-Temperatur:	245° C
Säulen-Temperatur:	230° C
Detektor-Temperatur:	270° C

Trägergas:	N_2 (Flow: 80 ml/min)
Detektor:	H_2 plus synthetisches Luftgemisch

Suppression:	1,3 x 10^{-8} Amp.
Range:	3 x 10^{-10} Amp.
Spannung:	6 Volt

Die für die Gaschromatographie vorbereiteten Plasma- und Urinproben (siehe Aufarbeitungsschemata auf den Abbildungen 14 und 15)

wurden in Spitzkölbchen HFN-derivatisiert (siehe "Reaktionen und Derivatbildung"), unter N_2 eingedampft und in 100-1000 µl Benzol aufgelöst. Ein Aliquot davon wurde entnommen,um mittels Flüssigkeits-Szintillationszähler die Radioaktivität zu bestimmen und so den Prozentsatz der Verluste bei Aufarbeitung des biologischen Materials zu errechnen.
Mit Mikrolitерspritzen (HAMITON) wurden 5 - 20 µl der Proben aus den Spitzkölbchen entnommen,auf Edelstahlspiralen aufgetragen,und nach Abdampfen des Lösungsmittels in den Festproben-Geber des Gaschromatographen eingelegt.

Die qualitative Bestimmung der in den untersuchten Proben vorhandenen Androgene erfolgte anhand der Retentionszeit in Relation zu einem jeder Probe zugesetzten "internen Standard" (IS).
Für unsere Bestimmungen wählten wir Testosteron-HFN bzw. Androstandiol-HFN als internen Standard.

Untenstehend sind die Retentionszeiten der HFN-Derivate in Relation zu den internen Standards Testosteron-HFN bzw. Androstandiol-HFN zusammengestellt (Rrt. = relative Retentionszeit).

Androgen-Derivat		Rrt.
Testosteron-HFN	=	1,0 (IS)
Androsteron-HFN	=	0,36
Etiocholanolon-HFN	=	0,41
DHEA-HFN	=	0,50
DHT-HFN	=	0,65
Androstandiol-HFN	=	1,51

Androgen-Derivat	Rrt.
Androstandiol-HFN	= 1,0 (IS)
Androsteron-HFN	= 0,24
Etiocholanolon-HFN	= 0,27
DHEA-HFN	= 0,33
DHT-HFN	= 0,43
Testosteron-HFN	= 0,66

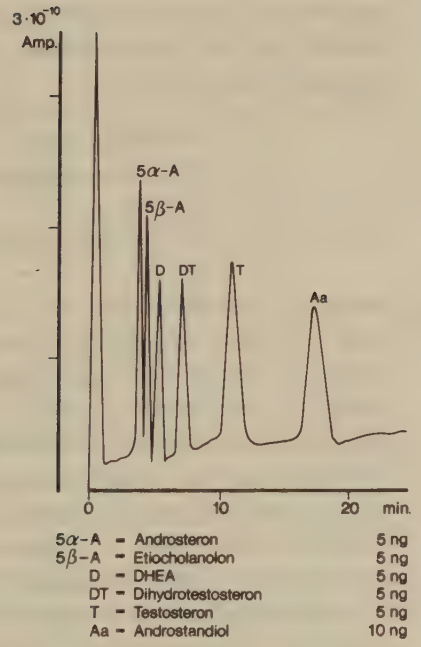

Abb. 13 : Gaschromatische Trennung eines HFN-Androgen-Standardgemisches auf einer 3 % QF-1-Säule (1,7 m lang, 2,5 mm Ø)

II.D. Extraktion und Reinigung :

II.D.1 Urin :

24-Stunden-Urin wurde gesammelt,die Menge festgestellt,und dann bei -20°C bis zur Analysierung im Labor eingefroren.

Vor der Aufarbeitung wurde der Urin bei Zimmertemperatur aufgetaut. 100 ml wurden der Gesamtmenge entnommen,und mit folgenden radioaktiv markierten Steroiden ("Tracer") versetzt,die der Identifizierung und der Berechnung der Wiederfindung während der Aufarbeitung dienten:

^{3}H-Androsteron	30000 dpm
^{3}H-Etiocholanolon	30000 dpm
^{3}H-DHEA	30000 dpm
4-^{14}C-Testosteron	15000 dpm

Dieser so vorbereitete Urin wurde dann durch eine 100 g - Amberlite - Säule (FAUCETTE,1971) mit 50 cm Länge und 2 cm Innendurchmesser gereinigt.Das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden die Steroide mit 500 ml Methanol von der Säule gewaschen und in einem 1000 ml-Rundkolben aufgefangen,mit dem Rotationsverdampfer eingedampft,in 50 ml Acetatpuffer (ph 4,8) aufgelöst,und in 100 ml-Rundkolben überführt.
Es wurden 6 ml Ketodase ® (= ca.30000 Fishman-Units) zugegeben,über Nacht bei 37°C inkubiert, und anschließend mit 4 x 50 ml Dichlormethan extrahiert.

Die vereinigten Extrakte wurden eingedampft,und in 3 x 1 ml Äthylenglykol-Portionen in 4 g Kieselgur aufgenommen. Dieses Material bildete die oberste Schicht (A) der modifizierten Celit-Gradientensäule (SCHINDLER,1972) wie auf Seite 24 beschrieben.

Material :	100 ml Urin
	↓
	"Tracer"-Zusatz
	↓
Reinigung :	Amberlite-Säule
	↓
Hydrolyse :	Ketodase R
	↓
Extraktion :	Dichlormethan
	↓
Trennung :	Celit-Gradientensäule
	↓
Derivatbildung :	Steroid-HFN
	↓
Quant.Best.:	Gaschromatographie

Abb. 14 : Überblick über das Vorgehen bei der quantitativen Bestimmung von Androgenen im Urin.

II.D.2 Plasma :

Zu 5 ml Plasma wurden jeweils folgende radioaktiv markierten Steroide zugesetzt:

^{3}H-Androstendion	10000 dpm
^{3}H-Androstandiol	40000 dpm
^{3}H-DHEA-Sulfat	40000 dpm
4-^{14}C-Testosteron	30000 dpm

Anschließend wurde mit 5 x 15 ml Äthanol-Äther (2:1,v/v) extrahiert. Die in einem Spitzkolben vereinigten Extrakte wurden bei 35°C im Rotationsverdampfer getrocknet,der Rückstand in 6 x 3 ml-Portionen von 70 %igem Methanol in ein Zentrifugenglas überführt, über Nacht bei -20°C ausgefroren,und schließlich 45 Minuten bei 10000 x g in einer Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge (SORVALL INC.RC-28) zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert,eingedampft und in 5 x 0,4 ml-Portionen auf eine Sephadex LH-20-Säule aufgetragen (SETCHELL,1973). Mittels des Elutionssystems Chloroform : Methanol = 1:1 in 0,01 molarem NaCl wurde der Plasmaextrakt in "freie (=ungebundene) Steroide" und in Sulfat-konjugierte Steroide getrennt.

Die Fraktion der "freien Steroide" wurde mittels der Aluminiumoxid-Säulenchromatographie in die weniger polaren Androgene Progesteron und Androstendion und die höher polaren Androgene DHEA,DHT,Testosteron und Androstandiol getrennt.

Die quantitative Bestimmung von Progesteron und Androstendion wurde mit Radioimmunassay durchgeführt.

Die höher polaren Androgene wurden nach HFN-Derivatisierung gaschromatographisch bestimmt.

Die Fraktion der sulfokonjugierten Androgene wurde nach dem Prinzip von VIHKO (1966) solvolysiert,und ebenfalls mittels Gaschromatographie quantitativ bestimmt.

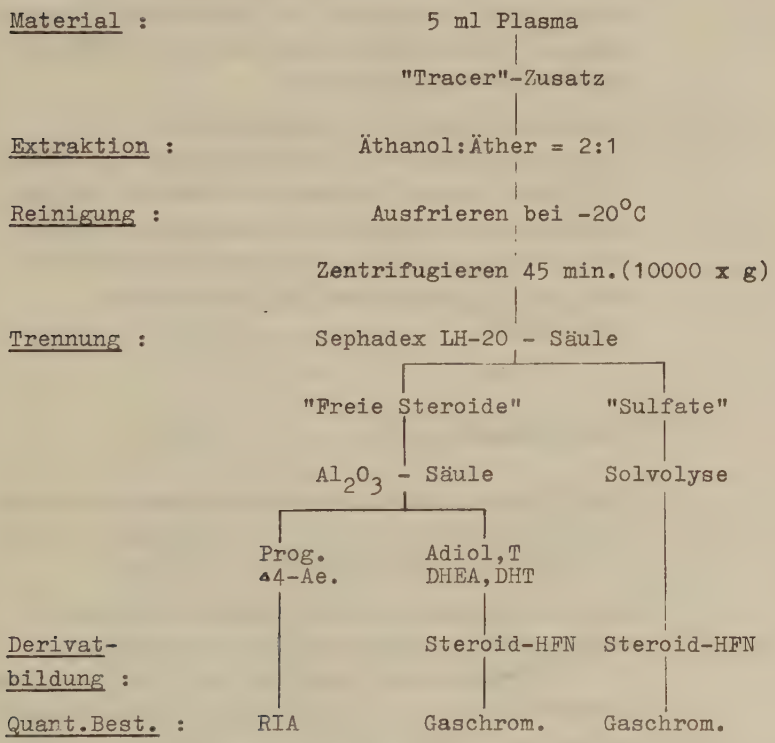

Abb. 15 : Überblick über das Vorgehen bei der quantitativen Bestimmung von Androgenen im Plasma.

II.E. Reaktionen und Derivatbildung :

II.E.1 Solvolyse :

Die Solvolyse der Steroid-Sulfate wurde wie von VIHKO (1966) beschrieben ausgeführt:

30 ml Essigester wurden mit 3 ml 2-molarer H_2SO_4 ausgeschüttelt. Nach einstündigem Äquilibrieren wurde die untere Phase (H_2SO_4) entfernt. Der überstehende angesäuerte Essigester wurde zu der eingedampften Steroidsulfatprobe gegeben, und anschließend bei 39°C im Wasserbad über Nacht inkubiert.

Schließlich wurde die Lösung mit 2 x 5 ml 8,4 % $NaHCO_3$ und 1 x 5 ml Aqua dest. gewaschen. Die Waschlösungen wurden in einem Spitzkolben gesammelt und mit 20 ml Essigester extrahiert. Der Extrakt und die gewaschene Probe wurden über Na_2SO_4 getrocknet und unter Vakuum eingedampft.

II.E.2 Crêpy-Reaktion :

Die Sulfatkonjugate von Androsteron, Etiocholanolon, Dihydrotestosteron und Testosteron wurden mit Hilfe der Crèpy-Reaktion bestimmt.

Ein Aliquot der zu untersuchenden Fraktion wurde unter N_2 eingedampft, der Rückstand in 2 ml Crèpy-Reagenz aufgelöst, mit 2 ml Aqua dest. verdünnt und mit 3 ml Chloroform ausgeschüttelt.

Die Extinktion des Chloroform-extrahierbaren Steroidsulfat-Methylenblau-Komplexes wurde bei 620 nm photometrisch bestimmt (CRÊPY u. RULLEAU-MESLIN, 1960).

II.E.3 Triäthylammoniumsulfat-Herstellung :

1,5-molares Triäthylammoniumsulfat wurde auf folgende Weise hergestellt:

Zu 210,7 ml Triäthylamin wurden 41 ml H_2SO_4 conc. in kleinen Mengen unter ständigem Rühren zugegeben. Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt, und der ph-Wert auf 7,0 eingestellt (MICKAN et al., 1969).

II.E.4 Bildung von HFN-Derivaten :

Die Herstellung von Androgen-HFN-Derivaten erfolgte nach dem Prinzip von M.A.KIRSCHNER und TAYLOR (1969) :

Zu je 50 mg der Steroide Androsteron, Androstandiol, DHEA, DHT, Etiocholanolon oder Testosteron wurden 250 µl über Al_2O_3 gereinigten Pyridins gegeben.
Die Zugabe von 5 ml 5 %igem HFN in Benzol ergab einen je nach Substanz verschieden starken flockig-weißen Niederschlag.
Während der 30-Minuten-Reaktion bei 56° C wurden die Proben gelegentlich kurz geschüttelt.

Anschließend wurden sie unter N_2 eingedampft, in 3 ml 70 %igem Methanol aufgelöst und mit 3 x 5 ml n-Hexan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und unter Vakuum eingedampft.

Die Kristallisation von Androstandiol-HFN erfolgte in Methanol nach Zugabe von einigen Tropfen Aceton.

Androsteron-HFN, Etiocholanolon-HFN und Testosteron-HFN wurden in n-Hexan auskristallisiert, DHT-HFN und DHEA-HFN in Methanol.
Nach zweimaligem Entfernen der "Mutterlauge" mit einer Kapillarpipette wurden die Kristalle über Nacht im Vakuum über Na_2SO_4 getrocknet.

Für die Herstellung von HFN-Derivaten aus Plasma-Extrakten wurden 200 µl, von Derivaten aus Urin-Extrakten 1000 µl der 5 %igen HFN-Lösung zur trockenen Probe gegeben, wobei auf Pyridinzusatz verzichtet wurde.
Nach 30-minütiger Reaktionszeit bei 56°C und Abdampfen unter Stickstoff wurden die Proben durch Dünnschichtchromatographie im System n-Hexan : Essigester = 8:2 gereinigt und anschließend mit Benzol eluiert.

II.F. Quantitative Bestimmung :

II.F.1 Flüssigkeits-Scintillationszähler :

Die quantitative Bestimmung radioaktiv markierter Steroide erfolgte in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (PACKARD TRI-CARB,Mod.3380).
Ein Aliquot der zu bestimmenden Fraktion wurde in einem Scintillationsgefäß eingedampft, und mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgelöst.
Als Scintillationsflüssigkeit diente ein Gemisch aus 1 l Toluol, 4 g PPO und 400 mg Dimethyl-POPOP.

Die Zählausbeute betrug für ^{14}C 90-94 %, für Tritium 50-57 %.

II.F.2 Gaschromatographie :

Die quantitative gaschromatographische Bestimmung der Androgene in den biologischen Extrakten erfolgte durch den Integrator-Rechner (AUTOLAB SYSTEM I, SPECTRA PHYSICS, Darmstadt) des Gaschromatographen.

Nach einem vorgegebenen Programm ermittelte der Rechner den qualitativen und quantitativen Androgengehalt der Proben anhand des "Internen Standards" und der "Korrekturfaktoren".
Der Interne Standard (IS) ist ein jeder zu bestimmenden Probe zugesetztes,in dieser selbst

jedoch nicht enthaltenes HFN-Derivat von bekannter Quantität, in unserem Fall waren es Testosteron-HFN bzw. Androstandiol-HFN.

Der Korrekturfaktor (KF) muß rechnerisch die ständigen kleinen Veränderungen des Chromatographie-Systems ausgleichen.

Für die quantitative Androgenbestimmung verwendete der Rechner folgende Formeln:

$$\text{Steroid (ng)} = \frac{\text{IS (ng)}}{100} \times \frac{KF_i \times \text{Fläche i}}{KF_{IS} \times \text{Fläche IS}} \times SF$$

$$SF \text{ (Scaling-Factor)} = \frac{\text{Peak-Fläche des IS}}{\text{Peak-Fläche d.authent.Steroids}}$$

Die Korrektur der Vermehrung des Molekulargewichts der Androgene durch die HFN-Derivatisierung erfolgte durch Multiplikation der Integratorergebnisse (ng) mit dem sog. HFN-Faktor :

$$\text{HFN-Faktor} = \frac{\text{Steroid-Molekulargewicht}}{\text{(Steroid-MG minus 1) + 429}}$$

HFN-Faktoren der einzelnen Androgene :

Androstandiol :	0,255
Androsteron :	0,404
Etiocholanolon:	0,404
DHEA :	0,403
DHT :	0,404
Testosteron :	0,403

Die konstanten Parameter, die wegen der wechselnden gaschromatographischen Bedingungen notwendigen Korrekturfaktoren für die einzelnen Steroide wurden durch Kalibration des gaschromatographischen Systems mit Standardproben ermittelt, die bekannte Mengen der zu bestmmenden Androgene enthielten.

Standardproben-Menge und Menge des Internen Standards wurden manuell in den Integratorrechner eingespeichert.
Zur Korrektur möglicher Veränderungen des Chromatographiesystems (Säule, Detektor, Temperatur, Flow) während des Chromatographie-Prozesses, und zur Rekalibration folgte nach 4 Messungen von Proben biologischen Materials jeweils 1 Standardprobe mit bekannten Mengen der zu bestimmenden Androgene (= Sequenz 4:1).

Für die quantitativen Bestimmungen der Androgene in den Extrakten aus Plasma und Urin wurde jede Probe zweimal gemessen, und daraus der Mittelwert errechnet.

Die quantitativen Ergebnisse der Sulfat-Fraktion sind als Masse der "freien" Steroide ohne Berücksichtigung der Sulfatgruppe angegeben.

II.F.3 Radioimmunassay (RIA) :

Die quantitative Bestimmung von Androstendion im Plasma erfolgte radioimmunologisch mit einem Antikörper gegen Androstendion in einer Verdünnung von 1 : 10000 nach der Methode von HOFFMANN et al.(1973).
Die Kreuzreaktion mit Testosteron betrug 2 %.

II.F.4 Bestimmung der 17-Ketosteroide :

Für die Bestimmung der 17-Ketosteroide im Urin wurden 1/50 der Uringesamtmenge untersucht.
Zuerst wurden die Glucuronid- und Sulfat-Komplexe hydrolysiert, anschließend die nun "freien" Steroide extrahiert, die Extrakte vereinigt und gereinigt.
Dann erfolgte der Nachweis mittels Farbreaktion nach ZIMMERMANN (1935), wobei die 17- Ketosteroide mit Meta-Dinitrobenzol in stark alkalischem Milieu reagierten unter Bildung eines violetten Farbkomplexes, der photometrisch bei 492 nm gemessen wurde.

II.G. Prüfung der Methode, Identifizierung :

II.G.1 Wiederfindung :

Vorversuche :

Aus einem Plasmapool wurden 18 mal je 5 ml entnommen.
Mit diesen Proben wurde die Zuverlässigkeit der oben beschriebenen Methode getestet.
Aus der Wiederfindung der jeder Probe zugesetzten radioaktiv markierten Androgene (Tracer) wurden Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der methodischen Verluste errechnet.

Folgende Werte für die Wiederfindung der einzelnen Androgene (gemessen vor der Herstellung von HFN-Derivaten) wurden ermittelt :

^{3}H-Androstendion :	MW: 82,55% ± 9,3 (SD)
^{14}C-Progesteron :	MW: 77,98% ±13,7 (SD)
^{14}C-DHEA :	MW: 87,7 % ±14,6 (SD)
^{3}H-Androstandiol, ^{3}H-DHT, ^{3}H-Testosteron:	MW: 73,8 % ±12,8 (SD)
^{3}H-DHEA-Sulfat :	MW: 88,3 % ±18,0 (SD)

II.G.2 Präzision und Richtigkeit :

Zur Prüfung der Präzision und Richtigkeit der gaschromatographischen Analysen wurden 5-fach-Messungen mit HFN-Derivaten von Testosteron, DHEA, DHT, Androsteron, Etiocholanolon und Androstandiol durchgeführt, und zwar im Bereich von 10 ng bis 50 ng (siehe Abbildung 16).

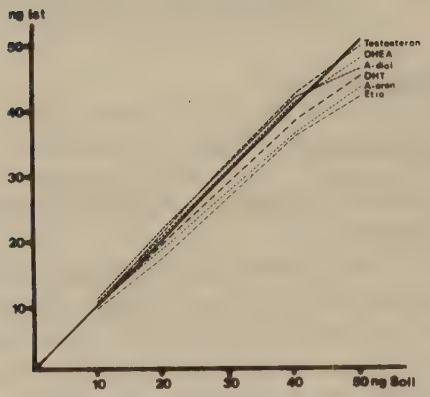

Abb. 16 : Präzision und Richtigkeit der gaschromatographischen Messungen der HFN-Derivate. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils fünf Messungen.
Empfindlichkeit des Detektors : $3x10^{-9}$ Amp.

II.G.3 Identifizierung und Spezifität :

Die Identifizierung der zu bestimmenden Androgene der Plasma- und Urinproben erfolgte durch Zusatz authentischer radioaktiv markierter Androgene (Tracer), sowie durch Vergleich der R_f- bzw. Rrt.-Werte bei der Dünnschicht-bzw.Gas-Chromatographie dieser radioaktiven Substanzen mit den gemessenen unmarkierten Steroiden.

III. KASUISTIK :

III.A. Klinische Beschreibung der Fälle :

Name d.Pat.	Histolog.Diagnose	Exp.No.
Sch. M.	Androblastom	1
Ma.E.	Androblastom	2
Bi.F.	Fam.Hirsutismus	3
Be.R.	Dermoidcyste	4
Ma.M.-L.	Cyst.Adenofibrom	5
Li.G.	Seröses Cystom	6
De.F.	Hiluszelltumor	7
La.F.	Hiluszellhyperplasie	8
Ve.D.	Androluteoma gravid.	9

Exp.No. 1, Sch.M. , Androblastom

Die zum Operationszeitpunkt 15 Jahre alte Patientin bemerkte seit ihrer Menarche mit 13 Jahren zunehmende Behaarung im Bereich des Gesichts und Abdomens, sowie an Ober-und Unterschenkeln.

Mit 14 Jahren stellte sich sekundäre Amenorrhoe ein. Ein halbes Jahr später wurde die Stimme auffällig tiefer und rauh, der Kehlkopf vergrößerte sich.

Bei der klinischen Untersuchung fielen vor allem der angedeutete männliche Behaarungstyp und die leichte Klitorishypertrophie auf.

Der Plasma-Testosteronwert sank unter dem Dexamethason-Test von 5 ng auf 3,4 ng/ml.Er zeigte auf ACTH keinen Anstieg, jedoch auf HCG.
Die Androstendionwerte waren mit 14,7 ng/ml auf über das 3-fache der Norm erhöht.
Auffallend erhöht waren die Sulfate von Androsteron, Etiocholanolon und DHEA im Plasma (Tabellen 2 - 5).
Die 17-Ketosteroide des 24 h-Urins lagen im Bereich von 9 mg/Tag.

Bei der Laparotomie wurde das vergrößerte linke Ovar mit einem 6 x 4 x 4 cm großen,bräunlichgelben Tumor entfernt.
Das rechte Ovar war makroskopisch unauffällig.

Internistischer Nebenbefund:
Bei der internistischen Untersuchung diagnostizierte man eine knotige Kolloidstruma,die vier Wochen nach der Laparotomie durch eine subtotale,rechtsseitige Strumektomie therapiert wurde.

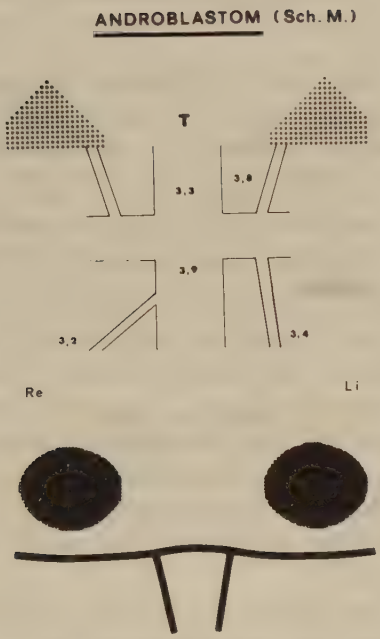

Abb. 17 : Testosteronwerte (ng/ml) in den Vv.ovaricae und Vv.suprarenales während der Katheterisierung dieser Venen.

Histologie :

Der gut abgegrenzte Tumor zeigte undifferenziertes, teileise cystisches Gewebe mit eosinophilen Leydigzellen,Sertolizellen und nicht doppelbrechenden Fetten.
Der Tumor bot keinen Anhalt für Malignität.

Histologische Diagnose : Androblastom (intermediärer Typ)

Exp.No. 2, Ma.E. , Androblastom

Der Zyklus der 28-jährigen Patientin war seit der Menarche mit 13 Jahren unregelmäßig,und schwankte zwischen 25 und 30 Tagen.

Mit etwa 25 Jahren stellte sich eine sekundäre Amenorrhoe ein, seit dieser Zeit befand sich die Patientin wegen unerfüllten Kinderwunsches in ärztlicher Behandlung.

Bei der klinischen Untersuchung zeigte die Patientin vom Gesamteindruck her virile Züge : Leichter Bartwuchs im Bereich der Oberlippe, jedoch nur leichte Hypertrichosis am gesamten Körper, kein echter Hirsutismus und keine typisch männliche Schambehaarung.
Bauch- und Beinmuskulatur waren kräftig entwickelt.
Die fast männlich wirkende Stimme war nach Angaben der Patientin der Patientin "schon immer" so tief gewesen.
Die Schilddrüse zeigte diffuse Vergrößerung.
Die Mammae waren leicht hyperplastisch.

Äußeres Genitale und Scheide zeigten keine Auffälligkeiten, die Klitoris keine wesentliche Vergrößerung.
Der Uterus war etwas klein, lag aber noch im Bereich der Norm.
Das rechte Ovar war deutlich vergrößert, das linke palpatorisch nicht mit Sicherheit nachweisbar.

Der stark erhöhte Plasma-Testosteronwert sank unter Dexamethason von 8 ng auf 6 ng/ml, und stieg durch HCG-Stimulation über 15 ng/ml (siehe Abbildung 18).

Die Androstendionwerte waren mit 9,2 ng auf das Doppelte der Norm erhöht (siehe Tabelle 6).

Die 17-Ketosteroide im Urin sanken unter Dexamethasongabe von 10,9 auf 6 mg/24 Stunden. Im Urin waren Androsteron, Etiocholanolon und DHT auffallend stark erhöht (s.Tab. 8).

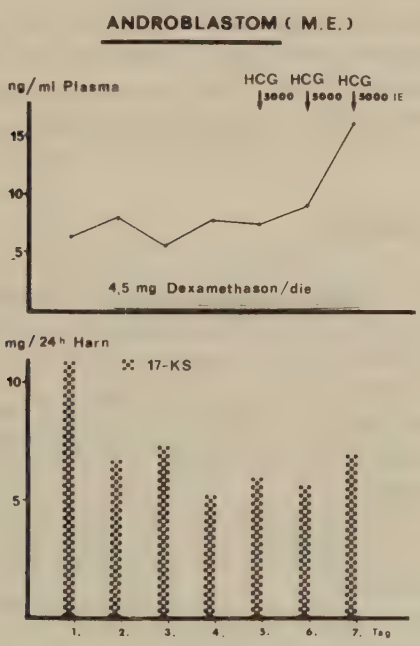

Abb. 18 : Verhalten von Testosteron (obere Hälfte der Abb.) und 17-Ketosteroiden während des Dexamethason-HCG- Testes.

Da differentialdiagnostisch neben einem Stein-Leventhal-Syndrom ein androgenproduzierender Tumor im Bereich der Ovarien in Frage kam, war eine Laparotomie indiziert :

Man fand auf der linken Seite ein normal großes Ovar vor, von auffallend grau-weißer Farbe und kleinen Cystenbildungen an der Oberfläche.
Das rechte Ovar hatte die Größe eines Hühnereies mit einzelnen Gefäßen an der Oberfläche und grau-weißer Farbe.
Beide Ovarien wurden intraoperativ gespalten:
Links war makroskopisch an den Schnittflächen kein Tumor erkennbar.
Wegen der grau-weißen Farbe und der oberflächlichen Cysten wurde eine Keilexcision vorgenommen.
Rechts erkannte man an der Schnittfläche einen braun-gelben Tumor. Dieses Ovar wurde exstirpiert.

Histologie :

Das rechte Ovar hatte eine Größe von 5 x 4 x 3 cm.
Auf der Schnittfläche war ein braun-gelber Tumor erkennbar, der bis auf einen schmalen Randsaum das Ovar völlig eingenommen hat. Dieser Randsaum bestand aus funktionstüchtigem Ovarialgewebe mit Follikeln und alten Gelbkörpernarben.
Der Tumor selbst, der um sich eine Pseudokapsel bildete, bestand aus tubulären Differenzierungsprodukten mit einem einschichtigen Epithelbesatz und lipidspeichernden Zellen.
Außerdem fand man mehr solide Differenzierungsprodukte, reichlich kollagenes, häufig hyalinisiertes Zwischengewebe.

Für Malignität bestand keinerlei Anhalt.

Histologische Diagnose : Androblastom (tubulärer Typ)

Die Keilexcision aus dem linken Ovar zeigte funktionstüchtiges Ovarialgewebe mit reichlich Primordialfollikeln, Sekundär- und Tertiärfollikeln und Corpora albicantia, jedoch kein Tumorgewebe.
Für ein Stein-Leventhal-Syndrom (PCO) bestand kein Anhalt.

Exp.No. 3, Bi.F. , Familiärer Hirsutismus

Mit Beginn der Pubertät im 13.Lebensjahr trat verstärkte allgemeine Körperbehaarung auf, die aber wegen der blonden Haare nicht besonders auffiel.

Seit einer normal verlaufenen Schwangerschaft und Entbindung mit 20 Jahren bemerkte die 34-jährige Patientin zunehmenden Hirsutismus, vor allem an Kinn,Wangen und an den Mammae. Die Schambehaarung reichte bis oberhalb des Nabels.
Am Unterrand der 10.Rippe rechts paramedial befand sich ein ca. 5 cm großer Naevus pilosus, der nach Angaben der Patientin seit 5 Jahren bestand.

Bei der gynäkologischen Untersuchung waren Vulva und Vagina unauffällig, die Klitoris nicht hypertrophiert, und die Ovarien nicht vergrößert.

Die Basaltemperaturkurve gab Hinweise auf eine sekundäre Ovarialinsuffizienz mit anovulatorischen, unregelmäßigen Zyklen.
Die Patientin, die bis zur Geburt des ersten Kindes regelmäßige Zyklen gehabt hatte, gab an, drei Monate lang nach der Geburt amenorrhoisch gewesen zu sein, dann stellten sich in den folgenden zwölf Monaten wieder regelmäßige Zyklen mit achtwöchigem Abstand ein. Bis zum 33.Lebensjahr wechselten dann die Zyklen zwischen genau vier und acht Wochen, und schwankten im darauffolgenden Jahr zwischen 30 und 45 Tagen, wobei die Patientin ziehende Schmerzen im Mittel- und rechten Unterbauch verspürte.

Die Stimme der Patientin war unauffällig, nicht vertieft. Aus der Familienanamnese waren keine endokrinologischen Störungen, kein Hirsutismus zu eruieren.
Bei der jetzt 15-jährigen Tochter der Patientin fiel jedoch seit der Menarche mit 13 Jahren verstärkter Haarwuchs an Armen und Beinen auf.

Das Plasma-Testosteron war auf 1,8 ng/ml erhöht, und ließ sich durch HCG nicht stimulieren, zeigte jedoch auf Dexamethason eine Suppression um 38 % und auf ACTH keine deutliche Reaktion. Der Androstendionspiegel war mit 5,7 ng/ml mäßig erhöht, und stieg während des

Dexamethason-Suppression - HCG-Stimulations - Testes auf 6,1 ng/ml an (siehe Tabelle 6).
Die 17-Ketosteroide sanken unter dem Dexamethasoneinfluß von 11,0 auf 5,0 mg/24 h ab.
Im Urin waren vor allem Etiocholanolon und Androstandiol erhöht (siehe Tabelle 8).

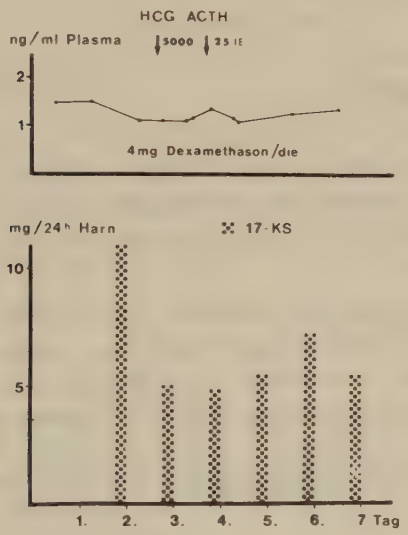

Abb. 19 : Verhalten von Testosteron (obere Hälfte der Abb.) und 17-Ketosteroiden während des Dexamethason-HCG-ACTH-Testes beim "Familiären Hirsutismus".

Bei der Katheterisierung der Vv. ovaricae und Vv. suprarenales zeigte sich eine Erhöhung des Testosteronspiegels in der rechten V.ovarica. Da auf Grund dieses Befundes ein Ovarialtumor

nicht auszuschließen war, entschloß man sich zur Laparotomie:
Das rechte Ovar zeigte hierbei kleincystische Veränderungen an der Oberfläche bei normaler Organgröße.
Am linken Ovar wurde eine Kapselverdickung festgestellt.
Aus beiden Ovarien wurde eine Keilexcision entnommen.

Histologie :

Das histologische Bild der Keilexcision aus dem rechten Ovar entsprach nicht den Veränderungen beim klinischen Stein-Leventhal-Syndrom.

Im linken Ovar zeigten sich histologisch neben zahlreichen Follikeln und einer Kapselverdickung funktionelle Cystenbildungen mit stellenweise hyperplastischer Marksubstanz.

Histologische Diagnose : Normales Ovar , kein Tumor,kein PCO

Exp. No. 4 , Be.R., Dermoidcyste

Bei der 23-jährigen Patientin war der Zyklus seit der Menarche mit 15 Jahren nie regelmäßig gewesen.
Nach Absetzen von Ovulationshemmern hatte sich eine sekundäre Amenorrhoe entwickelt, außerdem machte sich ein zunehmender Hirsutismus mit deutlich vermehrter Schambehaarung vom männlichen Typ bemerkbar.

Bei der gynäkologischen Untersuchung fand man ein unauffälliges äußeres Genitale, keine vergrößerte Klitoris, einen hypoplastischen Uterus und eine rechtsseitige Ovarialcyste, die eine langsame Wachstumstendenz zeigte.

Der auf 2,8 ng/ml erhöhte Plasma-Testosteronwert reagierte nur wenig auf Dexamethason (2,8 → 1,2) und HCG (1,2 → 1,65 ng/ml).
Die 17-Ketosteroide im Urin sanken während des Dexamethason-Testes von 9 auf 4 mg/24 h.
Im Plasma waren DHEA und Etiocholanolon erhöht.

Wegen der sich vergrößernden Ovarialcyste sowie auf Grund der erhöhten Testosteronwerte war die Laparotomie indiziert :

Bei dieser Operation wurde das rechte Ovar mit einer 5 x 6 x 5 cm großen Cyste mit vermehrter Gefäßinjektion und bernsteinfarbener Flüssigkeit exstirpiert.
Das linke Ovar war auf circa 6 cm vergrößert, und bot makroskopisch das Bild eines polycystischen Ovars. Aus diesem Ovar wurde eine Keilexcision entnommen.

Histologie :

Histologisch erkannte man auf den Schnitten des rechten Ovars neben der Cystenbildung Reste bandförmig ausgezogener Ovarialsubstanz.
Deutlich sichtbar waren die Anteile zweier Keimblätter: Neben Haaren mit Hautanhangsgebilden kamen Knochen und hirnähnliche Gewebspartien zur Darstellung. Entodermale Anteile konnten nicht nachgewiesen werden.
Aus dem untersuchten Material ergab sich kein Hinweis auf Malignität.

Histologische Diagnose : Dermoidcyste

Das Gewebe der Keilexcision aus dem linken Ovar zeigte mikroskopisch zwar eine verbreiterte Ovarialrinde mit angedeuteter Rindenfibrose, welche aber für ein Stein-Leventhal-Syndrom nicht typisch ausgeprägt war.

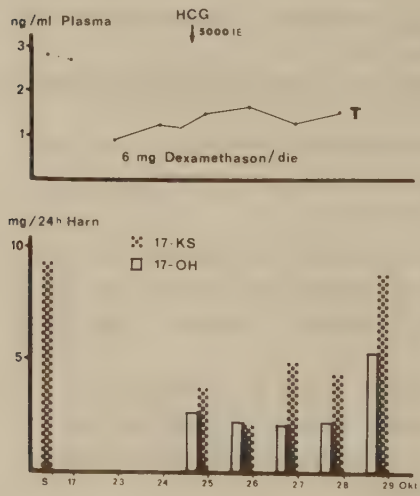

Abb.20 :

Verhalten von Testosteron, 17-Keto- und 17-OH-Steroiden während des Dexamethason-HCG-Testes bei der Dermoidcyste.

Exp. No. 5 , Ma.M.-L., Cystadenofibrom

Der Zyklus der 23-jährigen, gedrungen wirkenden Patientin blieb nach der Menarche mit 14 Jahren zunächst unregelmäßig, bis er sich ab dem 20.Lebensjahr stabilisierte.

Seit einem halben Jahr bestand eine Oligomenorrhoe. Auffallend waren der männliche Habitus, der an ein Turner-Syndrom erinnernde breite, kurze Hals, der deutliche Hirsutismus im Bereich des Gesichtes, und die männliche Schambehaarung.

Das äußere Genitale war unauffällig, die Klitoris nicht vergrößert, nur die großen Labien etwas hyperplastisch.
Rechts neben dem normal großen Uterus tastete man eine derbe Resistenz. Die linke Adnexe war frei.
Die Stimme war nicht verändert.

Nebenbefund war eine Hyperprolaktinämie (Werte um 2000µE) durch ein Hypophysen-Mikroadenom.

Der Plasma-Testosteronwert war mit 1,2 ng/ml nur leicht erhöht (siehe Tabelle 4).
Der Androstendionspiegel war mit 7,6 bzw. 9,0 ng/ml auf das Doppelte der Norm erhöht.
Auffallend war auch ein hoher Plasma-Androsteron-wert von 25,8 ng/ml (siehe Tabellen 2 und 6).
Die 17-Ketosteroide im Urin lagen bei 9 mg, und sanken unter Dexamethason auf 5 mg/Tag ab.

Die Reaktionen auf Dexamethason, ACTH und HCG waren gering (Abbildung 21).

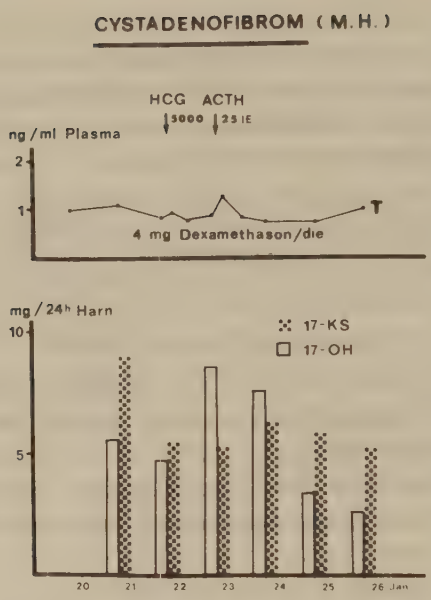

Abb. 21 : Verhalten von Testosteron, 17-Keto- und 17-OH-Steroiden während des kombinierten Dexamethason-HCG-ACTH-Testes beim Cystadenofibrom.

Bei der Laparoskopie wurde beidseits ein vergrößertes und mikrocystisch verändertes Ovar festgestellt. Damit war die Indikation zur Laparotomie mit Probeentnahmen für die histologische Untersuchung gegeben:

Das rechte Ovar zeigte sich hierbei gut mandarinengroß, polycystisch aufgetrieben mit vielen kleinen wasserhellen Cysten an der Oberfläche.
Auch das linke Ovar,welches etwa 3 x 6 cm groß war, zeigte dieses Bild.
An beiden Ovarien wurde deshalb eine Keilexcision vorgenommen.

Histologie :

Das Gewebestück aus dem rechten Ovar war teilweise mit einer glatten Kapsel überzogen,und zeigte an der Oberfläche kleine bis 5 mm große Cysten,die mit seröser Flüssigkeit gefüllt waren.
Mikroskopisch sah man zelldichtes,gefäßreiches Stroma mit Corpora albicantia und einer flach polypösen Vorwölbung durch eingeschlossene Cysten, die Zylinderepithelauskleidung aufwiesen.
In den Cysten war zum Teil homogenes eosinrotes Material erkennbar. Außerdem war eine Cyste mit mehrreihiger Granulosazellauskleidung entsprechend Follikelcysten sichtbar.
Auf dem histologischen Präparat sah man auch entzündliche Veränderungen im Stroma mit fibrinösem Exsudat, vereinzelten Blutungen,kleinen Nekrosen und Verkalkungen.

Die Keilexcision aus dem linken Ovar war außen von glatter Serosa überzogen,und zeigte auf den Schnitten zahlreiche subkapsulär gelegene,bis 8 mm große und mit seröser Flüssigkeit gefüllte Cysten.
Histologisch zeigte das Gewebe aus dem linken Ovar die gleichen Veränderungen wie das rechte Ovar.Außerdem waren Follikelcysten mit hämorrhagischem Inhalt und mehrreihiger Granulosazellauskleidung im sehr zelldichten Stroma zu sehen.
Histologische Diagnose : Cystisches Fibroadenom

Exp. No. 6 , Li. G. Seröses Cystom

Die 31-jährige Patientin bemerkte seit der Menarche mit 14 Jahren eine langsam sich verstärkende Körperbehaarung.
Ebenfalls seit dieser Zeit bestand eine Belastungsdyspnoe und ein leichter Hypertonus.
Eine familiäre Belastung bezüglich des Hirsutismus lag nicht vor.

Schon einige Jahre vor der ersten Gravidität im 31. Lebensjahr bestand eine bis zum Nabel aufsteigende vermehrte Schambehaarung. Bereits ein Jahr vor Beginn der Schwangerschaft rasierte sich die Patientin einmal wöchentlich im Bereich der Oberlippe.

Im 5. Schwangerschaftsmonat verstärkte sich der Haarwuchs vor allem am Stamm und im Gesicht (Oberlippen-Backenbart).
Die Frau bekam Stimmbruch, die Klitoris hypertrophierte deutlich.
Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft erreichte der Blutdruck im Rahmen einer Schwangerschaftstoxikose Werte bis zu 200/120 RR.
Um die Zeit des errechneten Termins kam es zur Spontangeburt einer 1700 g schweren, mazerierten weiblichen Frucht.

Auch nach der Geburt blieben die hohen Blutdruckwerte bestehen, und der bis zur Schwangerschaft meist regelmäßige Zyklus setzte nicht spontan ein.

Die Körperformen der Frau zeigten typisch ausgeprägte "cushingoide" Züge mit dünnen Armen und Beinen, Stammfettsucht und kräftig entwickelten Brüsten.

Die Werte der 17-Ketosteroide im Urin lagen im oberen Normbereich (10,3 mg/24 h), und ließen sich durch Dexamethason nur wenig supprimieren.

Die Arteriographie ergab keinen Anhalt für einen Nebennierenrinden-Tumor, sodaß eine Laparotomie indiziert war :
Vor und links vom Uterus zeigte sich ein gut mannsfaustgroßer cystischer, nur mäßig mobiler Tumor, der vom linken Ovar ausging, und zu 4/5 aus einer bräunlich-gelben Cyste bestand. 90 ml Cystenflüssigkeit konnten von dieser Cyste abpunktiert werden.

Das rechte Ovar hatte etwa Pflaumengröße, und zeigte an der Oberfläche fünf erbsgroße Verdichtungszonen.

Plasma-Hormone wurden in diesem Falle nicht bestimmt, da keine Blutproben zur Verfügung standen.

Histologie :

Histologisch handelte es sich bei dem Tumor um ein Cystoma serosum simplex.
Neben funktionstüchtiger Ovarialsubstanz mit einem cystischen Corpus luteum fanden sich Anteile einer Cystenwand, die von einem flach-kubischen Epithel ausgekleidet war. Der Tumor zeigte ebenso wie die Probebiopsie aus dem rechten, unauffälligen Ovar keinerlei Anhalt für Malignität.

Exp. No.7 , De.F. , Hiluszelltumor

Die Menarche der 63 Jahre alten Patientin war mit 17 Jahren eingetreten.
Nach einer Fehlgeburt bestanden keine weiteren Schwangerschaften.
Neun Jahre nach der Menopause im 50.Lebensjahr bemerkte die Frau diffusen Ausfall der Kopfhaare und zunehmende Behaarung, vor allem an Kinn, Brust,Abdomen und Beinen.
Die Stimme wurde tiefer.
Es entwickelte sich eine sehr ausgeprägte Klitorishypertrophie, sowie eine typisch männliche Schambehaarung.
Vagina und Uterus waren altersentsprechend atrophisch und unauffällig.

Der Plasma-Testosteronwert betrug 6-8 ng/ml. Sämtliche untersuchten Androgene (Androsteron, Etiocholanolon,DHT und Testosteron) waren um ein mehrfaches der Norm erhöht (s.Tab.2 - 7).

Die Reaktion der Testosteronwerte auf Dexamethason (6,5 → 4,5 ng/ml), HCG (4,5 → 5,8 ng/ml) und auf ACTH (4,4 → 8,0 ng/ml) war deutlich (s.Abb.22).

Auch die Androstendionwerte waren mit 28,8 ng/ml um das Siebenfache der Norm erhöht,und stiegen durch HCG-Stimulation bis 40,6 ng/ml(s.Abb.22).

Die 17-Ketosteroidausscheidung lag bei 8 mg/ Tag. Im Urin waren vor allem DHEA und DHT erhöht.

Aufgrund der stark erhöhten Androgene und der ausgeprägten Virilisierung war ein Tumor nicht auszuschließen,und somit eine Laparotomie indiziert:

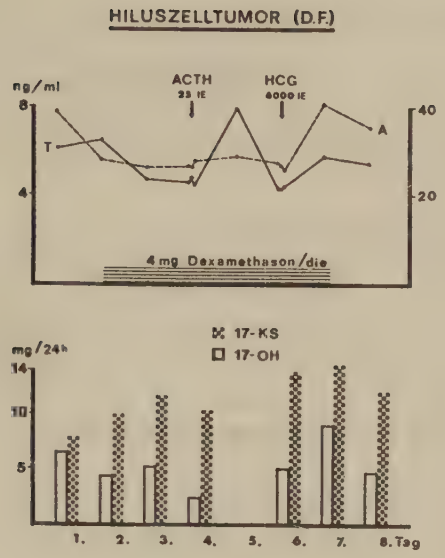

Abb. 22 : Verhalten von Androstendion (A), und Testosteron (T) , 17-Keto- und 17-OH-Steroiden während des kombinierten Dexamethason-HCG-ACTH-Testes.

Bei der abdominellen Totalexstirparion des Uterus mit beiden Adnexen zeigte sich das rechte Ovar unauffällig und atrophisch.
Das linke Ovar war demgegenüber ca. zwei Zentimeter größer, und schimmerte an der Rückfläche bläulich durch.
Am aufgeschnittenen Ovar konnte man einen 3 cm großen, intraovariellen grün-bläulichen, unregelmäßig abgegrenzten Tumor erkennen.

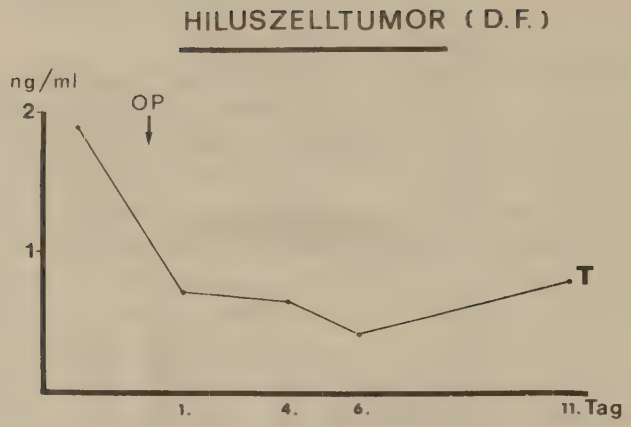

Abb. 23 : Postoperatives Verhalten des Testosteronspiegels im Plasma.

Histologie :

Auf dem Schnitt des rechten Ovars erkannte man mehrere Corpora albicantia, und im Bereich des Hilus leichte Hiluszellhyperplasie.

Die Histologie des linken Ovars zeigte unregelmäßig große Tumorzellen,deren Cytoplasma fein granuliert,und teilweise mit lipochromem Pigment ausgefüllt war. Die Zellkerne waren groß,meist rundlich. Zwischen den Tumorzellen,die dem Leydigzell-Typ entsprachen,fand sich ein spärliches, lockeres und kapillarreiches Bindegewebsgerüst.

Für Malignität gab es keinen Anhalt.

Histologische Diagnose : Hiluszelltumor

Exp. No. 8 , La.F. , Hiluszellhyperplasie

Nach einer Fehlgeburt im Alter von 24 Jahren hatte die jetzt 55-jährige Patientin drei Spontangeburten.
Mit 30 Jahren wurde sie cholecystektomiert,mit 32 Jahren thymektomiert wegen eines Thymoms,das alle zwei Jahre nachbestrahlt wurde.

Mit 49 Jahren wurde wegen eines Uterus myomatosus und Corpuspolypen die Gebärmutter entfernt.
Bei Eintritt in die Menopause wurde bei der kleinwüchsigen,adipösen Patientin ein Diabetes mellitus festgestellt.
Vier Jahre danach machten sich akut deutliche Virilisierungserscheinungen mit erheblichem Bartwuchs, Hypertrichosis auf Schultern und Rücken, männlicher Schambehaarung, deutlicher Klitorishypertrophie und tiefer Stimme bemerkbar.
Gleichzeitig fiel das Kopfhaar verstärkt aus.

Der Plasma-Testosteronwert betrug 2,1 ng/ml, zeigte kaum eine Reaktion auf Dexamethason und ACTH, stieg aber nach HCG auf 8,4 ng/ml an (Tab.4).
Der Androstendionspiegel lag über der oberen Norm, reagierte nur wenig auf Dexamethason und ACTH, und stieg nach Gabe von HCG auf das 5-fache der Norm (siehe Tabelle 6).

Bei der Katheterisierung der Vv. ovaricae wurden beidseits, vor allem aber rechts, deutlich erhöhte Testosteron- und Androstendionwerte festgestellt.

Die 17-Ketosteroidausscheidung im Urin betrug 8,4 bis 10,7 mg/24 h.

Bei der Laparotomie wurden die beiden Adnexe entfernt.
Dabei erwies sich das linke,grau-weiße Ovar mit einer Größe von 6,5 x 2,5 cm als hyperplastisch.
Das rechte Ovar war 4,5 x 2 cm groß.

Histologie :

Histologisch fielen im linken Ovar leicht höckerige, derbe, teils diffuse, teils herdförmige Hyperplasien der Stromazellen auf,die gelbliches Lipid eingelagert hatten.
Im Gewebe des rechten Ovars erkannte man ebenfalls diffuse Stromahyperplasie.

Bei beiden Ovarien ergab sich kein Anhalt für Tumorbildung und Malignität.

Histologische Diagnose : Hiluszellhyperplasie beider Ovarien

Exp. No. 9 , Ve.D.,Androluteoma gravidarum

Der Zyklus der 26-jährigen Patientin war seit der Menarche mit 14 Jahren immer regelmäßig gewesen.
Seit dem 22.Lebensjahr wurden Ovulationshemmer eingenommen.
Während der ersten Schwangerschaft im 26.Lebensjahr stellten sich von Anfang an leichte Virilisierungserscheinungen ein,die in der 29. bis 32. Schwangerschaftswoche zunahmen, und zu starkem Bartwuchs und ausgeprägter Akne im Gesicht,zu Hirsutismus am ganzen Körper und zu Klitorishypertrophie führten.

Der Plasma-Testosteronwert von 59,4 ng/ml zeigte keine Reaktion auf Dexamethason.
Der Androstendionspiegel war mit 27,9 ng/ml auf das über 6-fache der Norm erhöht,und sank unter Dexamethason auf 14,2 ng/ml ab.
Die 17-Ketosteroid [illegible]scheidung im Urin betrug 24 mg/Tag, und ließ sich durch Dexamethason nicht unterdrücken.
Im Urin waren Etiocholanolon, DHEA, Testosteron und Androstandiol stark erhöht.

Wegen der ausgedehnten Androgenproduktion war eine Laparotomie indiziert,die in der 32.Schwangerschaftswoche durchgeführt wurde :
Bei der Operation fand man ein normal großes,völlig unauffälliges rechtes Ovar vor.
Das linke Ovar dagegen war hühnereigroß und von äußerst weicher Konsistenz. Dieses Ovar wurde in toto entfernt.

Gleichzeitig wurde wegen Cervixinsuffizienz eine WURM-HEFNER-Naht gelegt.
Als um die 39.Schwangerschaftswoche die Oestrogenausscheidung als fetoplazentarer Parameter absank, wurde diese Naht gelöst, und die Schwangerschaft auf vaginalem Weg mit der Geburt eines 2500 g schweren gesunden Knaben beendet.

Histologie:

Auf der Schnittfläche des linken Ovars sah man einen deutlich abgegrenzten,weichen,bräunlichen, knotigen Tumor von etwa Walnußgröße.
Diesem Tumor lag das kollabierte Corpus luteum graviditatis an.
Die äußere Kapsel des Ovars war nicht durchbrochen, sie war glatt.
Lichtmikroskopisch erkannte man einen knotenförmigen Tumor,der von der Ovarialsubstanz durch eine Pseudokapsel abgegrenzt war, und sich aus dicht beieinander liegenden,eosinophilen,großen Zellen mit meist rundlichen,teilweise hyperchromatischen Kernen zusammensetzte.
Diese Tumorzellen ähnelten den Luteinzellen des Gelbkörpers. Im Cytoplasma sah man eine unterschiedlich starke Speicherung von Fettsubstanzen.
Zwischen den gruppenartig angeordneten Zellen befand sich schmales, gefäßführendes Bindegewebe.

Histologische Diagnose : Androluteoma gravidarum

III.B. Ergebnisse :

III.B.1 Plasma-Untersuchungen :

Androsteron: Die Laborwerte zeigen,daß dieses Hormon vorwiegend in sulfokonjugierter Form im Plasma vorliegt.
Beim Vergleich präoperativ-postoperativ zeigt sowohl der Spiegel des freien Androsterons als auch des sulfokonjugierten eine deutliche postoperative Abnahme.
Die Ergebnisse,die während des Dexamethason-Testes ermittelt wurden,lassen keine eindeutige Aussage zu.
Der höchste Wert wurde für den Tumor Nr.9 (Ve.D.) mit 110 ng/ml Plasma in sulfokonjugierter Form ermittelt. Bei dieser Patientin handelte es sich um eine sehr schwerwiegende Virilisierung während der Schwangerschaft.

Etiocholanolon im Plasma war in den Fällen 1,3,4,7,8 und 9 sehr deutlich erhöht.
Bei diesen Patientinnen konnte postoperativ ein deutlich niedrigerer Spiegel gemessen werden, mit Ausnahme der Patientin Nr.8.
Die Bestimmung von Etiocholanolon-Sulfat zeigte nur im Experiment No.9 (Ve.D) eine drastische postoperative Senkung der Plasmaspiegel. Auch hier sind die Veränderungen während des Dexamethason-Testes nicht eindeutig zu beurteilen,da es sich nur um wenige Daten handelt.

Dihydrotestosteron : Die Konzentrationen dieses Androgens im Blut lagen in allen Fällen auch postoperativ relativ hoch, sodaß ein methodischer Fehler für diese hohen Werte angenommen werden muß. Die Experimente 7 und 9 zeigen eine eindeutige Verminderung der Plasmaspiegel nach der Operation. Die gemessenen Werte des Sulfokonjugates von Dihydrotestosteron sind ebenfalls mit Vorbehalt zu verwerten. Es zeigt sich hierbei eine deutliche Verminderung der Plasmaspiegel nach der Operation bei den Patientinnen 1,2,5,7 und 8.

Dexamethason hatte keinen sehr wesentlichen Einfluß auf die Konzentration von Dihydrotestosteron im Plasma.Bei der Patientin No. 3 wurde unter HCG ein sehr hoher Anstieg des DHT im Plasma mit 47,2 ng/ml ermittelt.

Testosteron : Die Konzentrationen von Testosteron im Plasma waren in allen Fällen sehr deutlich erhöht,zum Teil in einem Bereich wie er normalerweise beim Mann vorkommt.
Durch Entfernung des Tumors wurden postoperativ alle Werte in den Normbereich gesenkt.
Ein ähnliches Verhalten zeigten die Konzentrationen des Testosteron-Sulfates mit Ausnahme der Patientinnen 4,5 und 9.
Die Gabe von Dexamethason verursachte in fast allen Fällen eine Senkung der Plasmakonzentration des freien Testosterons.
Durch HCG ließen sich die Testosteronwerte bei allen Tumoren stimulieren,nur beim familiären Hirsutismus war kein Anstieg zu beobachten.
Die Beurteilung der Veränderung von Testosteron-Sulfat unter Dexamethason-Einfluß ist aufgrund

der vorliegenden Daten nur schwer möglich.
Es zeigte sich lediglich bei 3 Patientinnen eine leichte Minderung der Plasmakonzentration von Testosteronsulfat unter Dexamethason.

Androstendion : Die Bestimmung von Androstendion im Plasma ergab bei 7 Patientinnen eine deutliche Erhöhung der Konzentrationen über den Normalwert. Nach der Entfernung der Tumoren fanden sich postoperativ niedrigere Werte.
Bei den Hiluszell-Tumoren waren die Androstendionwerte parallel zu den Testosteronwerten um den gleichen Faktor erhöht.
Beim cystischen Adenofibrom (Exp.No.5) dominierte das Androstendion:Während der Testosteronspiegel im Bereich der oberen Norm lag, war Androstendion um etwa das Doppelte der Norm erhöht.

Bezüglich der Reaktion der einzelnen Steroide in ihrer unkonjugierten und sulfokonjugierten Form auf Dexamethason mußte zusammenfassend Folgendes festgestellt werden:
Progesteron ließ sich in keinem der Fälle durch Dexamethason supprimieren.
Eine Stimulation des Progesterons durch HCG wurde nur bei einem Hiluszelltumor beobachtet.

Eine Suppression des Androstendions durch Dexamethason wurde beim Androblastom und beim Luteom beobachtet.
Ein Anstieg des Androstendionwertes durch HCG-Stimulation zeigte sich beim Hiluszelltumor und der Hiluszellhyperplasie. Beim familiären Hirsutismus war Androstendion nur gering stimulierbar.

Unkonjugiertes Testosteron ließ sich durch Dexamethason in allen Fällen nur geringfügig supprimieren. Die Werte des sulfokonjugierten Testosterons sanken beim Androblastom, beim familiären Hirsutismus und beim Hiluszelltumor auf fast die Hälfte ab.

Durch HCG ließ sich unkonjugiertes Testosteron bei folgenden Fällen stimulieren: Beim tubulären Androblastom, dem Hiluszelltumor, der Hiluszellhyperplasie. Sulfatkonjugiertes Testosteron zeigte bei der Dermoidcyste und dem Hiluszelltumor nach HCG-Verabreichung einen Anstieg.

Dexamethason hatte sowohl auf "freies" wie sulfokonjugiertes Dihydrotestosteron keinen wesentlichen Einfluß. Beim tubulären Androblastom sank das sulfatkonjugierte DHT unter Dexamethason deutlich ab.
Freies DHT stieg nach HCG-Gabe beim familiären Hirsutismus von 5,8 auf 47,2 ng/ml an.

Vom ungebundenen Androsteron konnte generell festgestellt werden, daß es durch Dexamethason nur leicht supprimiert werden konnte, und durch HCG nicht stimulierbar war.
Sulfatkonjugiertes Androsteron hingegen ließ sich deutlich durch HCG stimulieren, und zeigte auf Dexamethason keine Reaktion.

Die Tabellen 2 bis 7 geben die Ergebnisse der Plasmauntersuchungen wieder.

Exp. No.	Name d. Pat.	"FREIE STEROIDE"				"SULFATE"			
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.
1	Sch.M.	11,21	---	---	7,6	79,0	---	---	40,0
2	Ma.B.	---	1,74	---	3,05	10,0	13,0	---	---
3	Bi.F.	9,8	---	8,0	---	13,5	---	26,9	---
4	Be.R.	3,25	---	0,9	0,88	23,8	---	24,9	13,8
5	Ma.M-L.	25,9	---	---	17,9	25,9	---	---	9,24
6	Li.G.	---	---	---	---	---	---	---	---
7	De.F.	8,6	3,6	---	1,73	40,4	53,8	122,0	27,6
8	La.F.	4,9	---	---	1,8	62,5	---	---	23,5
9	Ve.D.	4,2	1,8	---	0,7	110,9	101,0	---	9,4

Tab. 2 : Androsteron: Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte: "freie Steroide" :0,12-1,0 ng/ml
"Sulfate" :30 - 53 ng/ml

Exp. No.	Name d. Pat.	"FREIE STEROIDE"				"SULFATE"			
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.
1	Sch.M.	5,97	---	---	4,5	86,6	---	---	---
2	Ma.B.	---	4,25	---	0,62	---	---	---	---
3	Bi.F.	9,3	---	---	---	---	---	---	---
4	Be.R.	32,6	---	20,0	11,9	---	---	---	---
5	Ma.M-L.	---	---	---	---	35,1	---	---	21,3
6	Li.G.	---	---	---	---	---	---	---	---
7	De.F.	15,6	---	---	0,57	15,25	16,8	26,8	---
8	La.F.	26,0	---	---	28,41	23,7	---	---	10,9
9	Ve.D.	---	2,65	---	0,22	109,0	122,7	---	21,2

Tab. 3 : Etiocholanolon: Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte: "Freie Steroide" :0,25-0,45 ng/ml
"Sulfate" :25 - 43 ng/ml

"Freie Steroide" = unkonjugierte Steroide
"Sulfate" = sulfokonjugierte Steroide

Exp. No.	Name d. Pat.	" F R E I E STEROIDE "				" S U L F A T E "			
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.
1	Sch.M.	5,3	3,4	3,3	1,15	7,2	---	---	1,41
2	Ma.E.	8,0	6,0	15,0	0,2	10,1	4,66	---	5,5
3	Bi.F.	1,8	1,15	1,18	---	12,0	5,8	---	---
4	Be.R.	2,8	1,2	1,65	0,9	8,1	---	9,1	15,9
5	Ma.M-L.	1,2	---	---	1,2	16,7	---	---	16,3
6	Li.G.	---	---	---	---	---	---	---	---
7	De.P.	6,3	4,5	5,8	0,8	20,7	14,0	40,7	12,4
8	La.F.	2,1	2,9	8,4	0,6	21,74	---	---	9,3
9	Ve.D.	59,4	51,4	---	1,4	9,7	16,0	---	11,3

Tab. 4 : Testosteron : Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte: "Freie Steroide":0,2-0,8 ng/ml
"Sulfate":keine Werte vorliegend

Exp. No.	Name d. Pat.	" F R E I E STEROIDE "				" S U L F A T E "			
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.
1	Sch.M.	1,65	---	---	1,32	12,0	---	---	5,46
2	Ma.E.	---	3,74	---	1,83	7,6	2,55	---	3,05
3	Bi.F.	5,8	---	47,2	---	1,5	---	---	---
4	Be.R.	1,95	---	2,35	2,8	---	---	---	2,05
5	Ma.M-L.	---	---	---	---	3,39	---	---	1,73
6	Li.G.	---	---	---	---	---	---	---	---
7	De.P.	7,28	6,18	---	2,42	5,72	6,66	8,3	1,24
8	La.F.	2,2	---	---	3,0	6,5	---	---	2,7
9	Ve.D.	5,3	10,0	---	0,86	---	---	---	2,89

Tab. 5 : Dihydrotestosteron:Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte: "Freie Steroide":0,05-0,3 ng/ml
"Sulfate":keine Werte vorliegend

"Freie Steroide" = unkonjugierte Steroide
"Sulfate" = sulfokonjugierte Steroide

Exp. No.	Name d. Pat.	" F R E I E STEROIDE "				
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	
1	Sch.M.	14,7	---	---	4,54	
2	Ma.E.	9,2	7,36	---	6,48	
3	Bi.F.	5,74	---	6,08	2,0	
4	Be.R.	---	---	---	4,07	
5	Ma.M-L.	7,6	---	---	9,0	
6	Li.G.	---	---	---	---	
7	De.F.	27,5	28,8	40,6	4,95	
8	La.F.	5,3	---	20,0	---	
9	Ve.D.	27,9	14,2	---	4,46	*

Tab. 6 : Androstendion^{+} : Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte : 1,1-3,2 ng/ml

Exp. No.	Name d. Pat.	" F R E I E STEROIDE "				
		prä-op.	unter Dexa.	unter HCG	post-op.	
1	Sch.M.	0,96	8,3	---	0,59	
2	Ma.E.	2,26	3,32	---	0,85	
3	Bi.F.	0,66	---	0,7	---	
4	Be.R.	---	---	0,7	0,42	
5	Ma.M-L.	0,21	---	---	0,38	
6	Li.G.	---	---	---	---	
7	De.F.	1,1	0,29	2,98	1,7	
8	La.F.	0,7	---	---	0,7	
9	Ve.D.	69,6	84,3	---	134,6	*

Tab. 7 : Progesteron^{+} : Plasmawerte in ng/ml
Normalwerte : 0,14- 0,35 ng/ml

+ = durch Radioimmunassay bestimmt
* = bestehende Gravidität

III.B.2 Urin-Untersuchungen :

17-Ketosteroide: Bei der Betrachtung der 17-Ketosteroidausscheidung der neun Patientinnen (präoperative Werte) zeigt sich durchweg,daß diese Werte im Normbereich liegen, das heißt,die androgenbildenden Ovarialtumoren haben auch in unseren Untersuchungen keine erhöhte 17-Ketosteroidausscheidung zur Folge. Somit ist die Bestimmung von 17-KS im Urin in der Regel nicht geeignet,Hinweise und differentialdiagnostische Kriterien für einen androgenproduzierenden Ovarialtumor zu liefern.
Eine Ausnahme hiervon macht jedoch der Tumor No.9, bei dem neben einer excessiven Testosteronproduktion während der Schwangerschaft eine 17-Ketosteroidausscheidung von 24mg/ Tag beobachtet werden konnte.

Die Konzentrationen der verschiedenen fraktionierten Androgene im Urin (Gesamtwerte:"Freie"Steroide +"Sulfat"-Steroide) liegen in unseren Untersuchungen generell relativ niedrig.
Mit Ausnahme der Testosteronausscheidung bei Experiment 7,8 und 9 sind die übrigen Werte alle im Normbereich.
Die in den Experimenten 2,3,6,7,8 und 9 erscheinenden Androstandiolwerte beruhen auf der gemeinsamen Wertung von 5 - und 5ß-Epimeren,und vermitteln somit scheinbar den Eindruck einer erhöhte Ausscheidung.

Exp. No.	Name d. Pat.	17-Keto-steroide	Andro-steron	Etiocholo-anolon	DHEA	DHT	Testo-steron	Andro-stendiol
		Normbereich: 7-15 mg/24 h	1,8-4,0	1,2-3,8	0,4-1,4		0,004-0,008	0,011-0,023
1	Sch.M.	9,0	---	---	---	---	---	---
2	Ma.E.	10,9 Dexa:6,0	0,52 0,58	0,56 0,15	0,22 0,11	0,14 0,48	0,014 ---	0,26 0,42
3	Bl.F.	11,0 Dexa:5,0	0,2	0,47	0,15	0,19	0,012	0,6
4	Be.R.	9,0 Dexa:4,0	---	---	---	---	---	---
5	Ma.M-L.	9,0 Dexa:5,0	---	---	---	---	---	---
6	Li.G.	14,0 Dexa:	0,39 0,52	0,69 1,11	0,14 0,59	0,35 0,25	0,002 ---	0,27 0,18
7	De.F.	8,0 Dexa:12,0	0,33 0,43	0,32 0,18	--- 0,73	0,24 0,99	0,08 0,09	0,13 0,31
8	La.F.	8,4 Dexa:10,2	0,51	0,62	0,11	0,36	0,036	0,47
9	Ve.D.	24,0 Dexa:22,0	0,87 1,51	0,75 3,3	1,14 2,15	0,36 0,62	0,25 1,39	1,4 3,03

Tabelle 8 : Ergebnisse der präoperativen Urin-Untersuchungen. Werte in mg/24 h
"Dexa" = während d.Dexamethasontestes

IV. Diskussion

Die Richtigkeit und Spezifität der Methode wurde durch die einer jeden Plasma- bzw. Urinprobe zugesetzten radioaktiv markierten Androgene (Tracer) gewährleistet.

Durch Übereinstimmung der R_f-Werte bei der Dünnschicht- und Gaschromatographie dieser radioaktiven Steroide mit den gemessenen unmarkierten Steroiden in den jeweiligen Proben wurde die Identität nachgewiesen.

Die Genauigkeit der Methode wurde durch Vorversuche ermittelt :
73,8 bis 88,3 Prozent der radioaktiv markierten Androgene konnten nach Anwendung der Methode in den Extrakten wiedergefunden werden.
Die Standardabweichungen von $\pm$9,3 bis $\pm$ 18,0 sprechen für eine hinreichende Präzision der Methode.

Zur Prüfung der Richtigkeit der gaschromatographischen Messungen wurden fünf-fach-Messungen mit HFN-Derivaten von Androgenen durchgeführt (siehe Abbildung 16).

Die Empfindlichkeit der Methode beträgt etwa 1 ng Steroid je Probe.

Die vorliegend beschriebenen Tumoren lassen sich nur teilweise in die in der Einleitung aufgeführten Einteilung nach SCULLY (1963) einordnen. Nicht in der Einteilung aufgeführt sind die Dermoidcyste, das Cystadenofibrom und das seröse Cystom, weil diese Tumoren nach den bisherigen Erfahrungen nicht zu den androgenbildenden gezählt werden.

Bei der Zusammenschau aller beschriebenen Tumoren muß festgestellt werden, daß die wichtigsten Androgene, nämlich Testosteron und Androstendion, in allen Fällen über die Norm erhöht sind.

Im Gegensatz hierzu steht die Tatsache, daß die Ausscheidung der 17-Ketosteroide nur in einem Fall (Exp.No.9) über die Norm erhöht ist.
Die Erklärung hierfür ist folgende:
Testosteron selbst ist kein 17-Ketosteroid, und nur etwa 40 % des täglich sezernierten Testosterons werden zu 17-Ketosteroiden abgebaut.
So hat eine zur Virilisierung führende tägliche Testosteronproduktion von 2,5 mg (=10-faches der Norm) eine Erhöhung der 17-Ketosteroide im Urin von nur 1 mg zur Folge, ein Betrag, der durch die Unspezifität der Bestimmungsmethode und die tägliche Schwankungsrate nicht auffällig wird (LIPSETT in GOLD, 1975).

Es ist möglich, daß die fraktionierte Bestimmung der 17-Ketosteroide aussagekräftiger ist:
17α-Ketosteroide bestehen vor allem aus Androsteron und Etiocholanolon, und geben Aufschluß über vermehrte ovarielle Produktion, während 17ß-KS vorwiegend aus DHEA bestehen, und einen adrenalen Parameter darstellen.

MAHESH (1968) berichtet über deutlich erhöhte 17-Ketosteroidausscheidung bei virilisierenden Nebennierenrinden-Tumoren.
OSBORN (1969) und LIPSETT (1970) fanden nur mäßig erhöhte 17-KS-Werte bei Lipoidzell-Tumoren (adrenal rest-cell tumors) der Ovarien.
GOLDSTEIN (1970) und LORIAUX (1970) berichten über vorwiegend normale 17-Ketosteroid-Ausscheidung bei Androblastomen.

Vermehrte Androgenbildung bei der Frau führt in Abhängigkeit von der Aktivität und der Produktionsrate der gebildeten Androgene und der Dauer ihrer Einwirkung zur Defeminisierung und schließlich zur Virilisierung.
Diese Symptome zeigten sechs der untersuchten Tumoren:
Die beiden Androblastome, seröses Cystom, Hiluszelltumor, Hiluszellhyperplasie und Androluteoma gravidarum.
Außer dem tubulären Androblastom und der beidseitigen Hiluszellhyperplasie gingen alle diese virilisierenden Tumoren vom linken Ovar aus.
Die Symptome des Überschusses an Androgenen sind annähernd proportional der Dauer ihrer Einwirkung und ihrer androgenen Aktivität.
Man kann davon ausgehen, daß Vertiefung der Stimme und Klitorishypertrophie als die wesentlichen Kriterien der Virilisierung erst bei deutlich erhöhten Werten von Testosteron auftreten.

Typisch für das Androblastom ist, daß es im Alter zwischen 15 und 30 Jahren auftritt.
NOWAK (1965) beschrieb ein Androblastom bei einem 2 1/2 Jahre alten Mädchen. Auch unsere Patientinnen waren beim Auftreten der ersten Symptome in der Pubertät (Sch.M.) bzw. im frühen Fertilitätsalter (Ma.E.).

Histologisch können die Androblastome solid oder cystisch ausgeprägt sein.
Charakteristisch sind gelb-orange bis gelb-bräunliche Gewebspartien,die auch in unseren beiden Fällen zu sehen waren.
Nach MEYER (1931) werden histologisch drei Haupttypen unterschieden: Eine hochdifferenzierte tubuläre Form (in unseren Untersuchungen Exp.No.2), eine intermediäre (Exp.No.1) und eine undifferenzierte sarkomähnliche Form.
Die vorwiegenden histopathologischen Strukturen des tubulären Typs waren den Hodenkanälchen ähnliche Differenzierungsprodukte.
Beim intermediären Typ fanden sich neben dem cystischen Gewebe auch lipoidhaltige Zwischenzellen,die morphologisch und funktionell wahrscheinlich den Leydigschen Zwischenzellen des Hodens entsprechen, und als Bildungsort der Androgene angesprochen werden müssen.
Nach FRASER (1953) entstammt das Androblastom direkt dem ovariellen Stroma,und stellt gemischte mesodermale Tumoren dar, die paramesonephritisches Coelomepithel (MÜLLER) und Hodengewebe enthalten.

Die 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Urin war in beiden Androblastom-Fällen mit 9,0 bzw. 10,9 mg/Tag nicht erhöht. Sie ließ sich durch Dexamethason

nicht vollständig wie bei einem Gesunden unterdrücken, sondern nur bis 6 mg/24 h.
MAHESH (1970) bestätigt diese geringe, jedoch unvollständige Suppression bei Androblastomen.

Der um das 10-fache erhöhte Plasma-Testosteronwert macht sich in der vermehrten Androsteron- und Etiocholanolon-Ausscheidung im Urin bemerkbar. Die beiden Androblastome haben sowohl eine erhöhte Testosteron- als auch Androstendionproduktion gemeinsam.
Unterschiedlich war jedoch, daß beim intermediären Androblastom "freies" Testosteron um das 1,5-fache mehr erhöht war als Androstendion, beim tubulären Androblastom jedoch Testosteron um das 5-fache stärker erhöht war als Androstendion.
Bemerkenswert war ferner, daß beim intermediären Androblastom vor allem die sulfokonjugierten Steroide vermehrt sezerniert wurden, im wesentlichen Androsteron und Etiocholanolon, die beide beim tubulären Androblastom unauffällig waren.

Beim tubulären Typ fiel eine hohe DHEA-Produktion auf, die sowohl in ihrer sulfo- wie unkonjugierten Form durch Dexamethason supprimierbar war.
Auch DHT- und Testosteron-Sulfate waren durch Dexamethason unterdrückbar, und "freies" Testosteron zeigte einen Anstieg von 6 auf 15 ng/ml nach HCG-Stimulation.
Beide Androblastome zeigten keine Reaktion auf ACTH-Gabe.

Diese Ergebnisse lassen Vergleiche mit LAATIKAINEN, PELKONEN und VIHKO (1971) zu, die bei einem androgenproduzierenden Gynandroblastom und einem Androblastom als wichtigstes sulfokonjugiertes Steroid Androsteron, und nicht DHEA wie bei der gesunden Frau gefunden haben.

In Übereinstimmung mit diesen Autoren fand sich bei unserem intermediären Androblastom ein erhöhter Etiocholanolon-Sulfat-Wert.
Nach den Berichten der oben genannten Autoren reagierten Androsteron- und Etiocholanolon-Sulfat nicht auf Dexamethason, sehr stark jedoch auf HCG. Diese Erfahrung machten wir zwar nicht direkt an den beiden Androblastomen, sondern generell bei den beschriebenen Störungen von Seiten des Ovars.

Während wir bei einem Androblastom vermehrt Androsteron- und Etiocholanolon-Sulfat, und beim anderen vermehrt DHEA-Sulfat fanden, berichteten KASE und CONRAD (1964) über Erhöhungen beider Sulfate (DHEA und Androsteron) bei einer einzigen Patientin mit virilisierendem Arrhenoblastom.

GREENBLATT (1972) beschrieb zwei Fälle von Androblastomen, die erhöhte Hämoglobinwerte zeigten. Diese waren auf die hämatogene Stimulation der Androgene zurückzuführen. Diesbezüglich stellten wir keine Untersuchungen an.
Bemerkenswert ist die Tatsache, daß bei beiden Androblastompatientinnen eine Struma diffusa bestand.

Die Diagnose "idiopathischer Hirsutismus" ergibt sich nach Ausschluß endokriner Störungen seitens der Ovarien oder der Nebennierenrinde, wenn kein Stein-Leventhal-Syndrom, kein androgenproduzierender Ovarial- oder NNR-Tumor oder -Hyperplasie vorliegt. Medikamentös oder rassisch (Mittelmeerländer) bedingter vermehrter Haarwuchs müssen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Wie problematisch noch immer die Abgrenzung des polycystischen Ovars (PCO) vom familiären

Hirsutismus ist, zeigt auch unser Exp.No.3, bei dem die Ovarien makroskopisch einem PCO glichen. Erst histologisch konnte ein Stein-Leventhal-Syndrom ausgeschlossen werden.
Selbst die histologische "Markhyperplasie" erklärt noch nicht eindeutig den familiären Hirsutismus, sondern läßt an eine familiäre Hyperthecosis denken.

Als gesichert kann gelten, daß beim PCO die Testosteronproduktionsrate erhöht ist (BARDIN, 1968). Aber auch beim familiären Hirsutismus wurden bei allen vom KIRSCHNER (1976) untersuchten Patientinnen erhöhte Testosteron- und Androstendionwerte festgestellt, wobei fast alle diese Patientinnen normal große Ovarien hatten.
Diese und auch die folgende Feststellung KIRSCHNER's stimmt mit unseren Untersuchungen überein:
Der Testosteronspiegel war in den Venae ovaricae höher als in den Vv. suprarenales.
Auch unsere Feststellungen normal großer Ovarien und der Supprimierbarkeit von Testosteron bei nur leichtem Hirsutismus und niedrigen Testosteron- und Androstendionspiegeln stimmen mit KIRSCHNER (1976) überein.
Androsteron und Etiocholanolon waren um das 10- bis 20-fache erhöht.

Kontrovers erschien die kaum vorhandene Stimulierbarkeit von Testosteron und Androstendion durch HCG, und die 20-fache Erhöhung von DHT durch dieses Medikament.
Bemerkt werden muß auch die auffallende Stimulierbarkeit aller untersuchten sulfokonjugierten Androgene durch HCG.

Sowohl beim polycystischen Ovar als auch beim familiären Hirsutismus wurden beim kombinierten Dexamethason-Test positive (BENJAMIN,1970) wie negative (s.S.12) Testergebnisse (ETTINGER,GOLDFIELD) festgestellt.
In unserem Fall ließen sich die 17-Ketosteroide im Urin von 11 auf 5 mg/24 h supprimieren.

Um die Diagnose des idiopathischen (familiären) Hirsutismus als Ausschlußdiagnose stellen zu können,ist im Zweifelsfall eine gynäkologische Laparoskopie oder Laparotomie indiziert.

Die zunehmende Behaarung bei der 14-jährigen Tochter der Patientin läßt auch an eine genetisch bedingte Verminderung des Sexhormon-bindenden Globulins SHBG (VERMEULEN,1972) vermuten, ebenso wie eine erhöhte Metabolisierung von DHT in den Haarfollikeln (LIPSETT,1973).

Die Ovarien der Patientinnen 4 und 5 erinnerten makroskopisch an die eines Stein-Leventhal-Syndroms.

Beiden gemeinsam waren die im Vergleich zu den anderen beschriebenen Fällen relativ wenig erhöhten Werte von Testosteron und Androstendion, die Supprimierbarkeit der 17-Ketosteroide um etwa die Hälfte des Ausgangswertes, und das fehlende Ansprechen beider Tumoren auf HCG.

Das Cystadenofibrom bildete mehr Androstendion als Testosteron:
Testosteron war um etwa das 1,5-fache der oberen Norm erhöht, Androstendion um das zweifache.

Bei diesem Tumor war auch eine geringe HCG- und ACTH-Stimulation des Testosterons feststellbar.

Freies Androsteron war um das 25-fache erhöht.

Das Cystadenofibrom ist ein relativ seltener Tumor, und wurde 1927 zum ersten Mal von FRANKL und WOLF unabhängig voneinander beschrieben. Der Ausgangspunkt dieses Tumors ist das paramesonephritische Coelomepithel, das die endokrinologischen Fähigkeiten des NNR-Stromas besitzt.

Die Cystadenofibrome enthalten Gruppen von papillären Cystadenomen, die vor allem aus dichtem zusammennängenden Gewebe zusammengesetzt, und durch einschichtiges Zylinderepithel bedeckt sind.
JANOVSKI (1973) glaubt, daß die fibrösen Elemente in diesen Tumoren von undifferenziertem mesenchymalem Gewebe abstammen.
Die Cystadenofibrome werden hauptsächlich in und nach der Menopause beobachtet. Unsere 23-jährige Patientin macht in diesem Punkt eine Ausnahme von den allgemeinen Beobachtungen.

Normalerweise sind diese Tumoren hormonell inaktiv, aber in einigen Fällen war das Ovarstroma vorherrschend, und zeigte Luteinisierung.

Häufig sind diese luteinisierten Tumoren mit Endometrium-Carcinom, Endometrium-Polypen oder Endometrium-Hyperplasie assoziiert. In 25 % ist das Cystadenofibrom gleichzeitig in beiden Ovarien zu finden (JANOVSKI, 1973).

Die Frage, ob das bei unserer Patientin (Exp.No.5) beobachtete Mikroadenom der Hypophyse mit daraus folgender Hyperprolaktinaemie mit der Defeminisierung in einem kausalen Zusammenhang steht, oder nur ein Nebenbefund ist, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden.

Im Kindes- und Jugendalter ist die gutartige Dermoidcyste (cystisches Teratom) der am häufigsten gefundene Ovarialtumor.
In 12 % der Fälle ist das cystische Teratom bilateral zu finden. Es können auch in einem Ovar gleichzeitig 2–3 Dermoidcysten vorkommen.

Die einfachste Form des cystischen Teratoms ist die Cyste, die mit verhornendem Plattenepithel ausgekleidet ist.
Meist findet man aber den sog. komplexen Typ des cystischen Teratoms, in dem Gewebe aus allen drei Keimblättern vorhanden sind, ähnlich wie bei unserer Patientin, bei der Gewebe aus zwei Keimblättern zu finden war. Der Tumor ist meist rundlich, an der Schnittfläche sieht man eine Cystenhöhle, die mit Talg und Haaren ausgefüllt ist. Nach Entfernung des Cysteninhalts findet man meist Zähne und das charakteristische Dermoidzäpfchen (JANOVSKI).

Welche histologische Struktur in unserem Fall für den Hirsutismus verantwortlich war, konnte man aus der histologischen Untersuchung nicht entnehmen.

Testosteron war bei unserer Dermoidcyste um das 3-fache der Norm erhöht, Etiocholanolon um das 60-fache.

Das seröse Cystom ähnelte in seinen klinischen Syptomen teilweise den Androblastomen: Grad der Virilisierung, Beginn in der Pubertät, die im Bereich der oberen Norm liegenden 17-Ketosteroidwerte, und ihre geringe Supprimierbarkeit durch Dexamethason waren ihnen gemeinsam. Auffallend jedoch waren der schon fast 17 Jahre bestehende Hirsutismus, die Exacerbation der Virilisierung im 5.Schwangerschaftsmonat, und die cushingoiden Symptome.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt,daß MORRIS (1958) von 11 Fällen von virilisierenden Lipoidzelltumoren des Ovars berichtete, die verschiedene Ausprägungen des Cushing-Syndroms zeigten.

Der Begriff der "ovariellen Hiluszellen" wurde 1949 von STERNBERG geprägt, obwohl diese Zellen schon 1906 durch KOHN in Prag beschrieben worden sind.
Ihre Ähnlichkeit mit den Leydigzellen des Hodens erkannte BERGER (1922).
STERNBERG (1949) fand Hiluszellen in etwa 80 % aller postpubertären Frauen,und beschrieb ihre zahlenmäßige Zunahme nach der Menopause.
Diese Zellen sind meist längs des Hilus ovarii und des anliegenden Mesovariums angeordnet.
Charakteristisch für die Hiluszellen ist ihre gruppenförmige Lage in der Umgebung markloser Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäßen.

BERGER (1942) zeigte, daß entweder diffuse Hyperplasien von Hiluszellen, oder ein Tumor, der aus diesen Zellen zusammengesetzt ist, Virilisierungserscheinungen verursachen.
Meist handelt es sich um kleine,solide oder cystische, gelbliche, gut abgrenzbare Tumoren, die selten mehr als 5 cm im Durchmesser haben, und gutartig sind. Sie treten im Gegensatz zu den Androblastomen hauptsächlich in der Meno- und Postmenopause auf.

RIPPMANN et al.(1968) berichteten von 3 Fällen, bei denen Hiluszelltumoren in der Schwangerschaft auftraten.
VÖLPEL (1971) beschrieb eine noduläre Hiluszellhyperplasie in Verbindung mit dem adrenogenitalen Syndrom.
ALLANDER und WAGERMARK (1969) stellten fest,daß von 55 beschriebenen Patientinnen mit Hiluszelltumoren 11 davon einen Diabetes mellitus hatten,sahen aber darin keinen auffälligen Zusammenhang.

Unsere Patientin La.F. (Exp.No.8) hatte ebenfalls einen Diabetes mellitus.
STERNBERG et al.(1953) vermuteten,daß der erhöhte Gonadotropinspiegel in der Postmenopause den Stimulus für die Hyperplasie oder die Tumorbildung der Hiluszellen darstellen. Diese Autoren beobachteten nämlich Hiluszellhyperplasien in einigen Fällen von ovarieller Agenesie und beim Turner-Syndrom.
WARREN (1964) beschrieb einen Hiluszelltumor in einem dysgenetischen Ovar.

Bei der histologischen Untersuchung der Hiluszelltumoren findet man rundlich-polygonale Zellen mit einem relativ großen Zellkern mit einem oder mehreren runden prominenten basophilen Nucleoli. Diese Zellen ähneln den Leydigzellen des Hodens,den Luteinzellen des Ovars, und den Zellen der Nebennierenrinde.
Aus diesem Grund prägten HAINES und TAYLOR (1962) den Sammelbegriff "Lipid-Tumoren" für den Hiluszelltumor, den Nebennierenrest-Tumor und das Luteoma gravidarum.

Die für die Hiluszelltumoren charakteristischen REINKE-Kristalloide sind acidophile Strukturen innerhalb des Cytoplasmas. Diese Kristalloide werden nur in den Leydigzellen des Hodens und den Hiluszellen des Ovars beschrieben, und sind deswegen eine wesentliche Hilfe bei der histologischen Diagnosestellung, obwohl ihr Fehlen- wie in unseren Fällen- die Diagnose des Hiluszelltumors nicht ausschließt.

Nach SCULLY (1963) ist wie beim Androblastom die 17-Ketosteroid-Ausscheidung im Urin im oberen Normbereich oder nur leicht erhöht.Bei unseren

Patientinnen stiegen diese Werte nach Dexamethasongabe noch an, statt wie erwartet abzufallen.

Auffallend waren bei Exp.No. 7 die 3o-fache,bzw. in Fall Nr.8 die 50-fache Erhöhung freien Etiocholanolons, sowie die 8-fache Erhöhung unkonjugierten Androsterons in Exp.No.7.

Unkonjugiertes Testosteron war um das 8-fache (Tumor) bzw. das 2,5-fache (Hyperplasie) der oberen Norm angestiegen.
Auch Androstendion war beim Hiluszell-Tumor stark erhöht, und zwar um das 7-fache der oberen Norm, bei der Hyperplasie um das 1,5-fache.

Die sulfokonjugierten Androgene waren auffallend erhöht.
Durch HCG waren vor allem die Sulfate von Androsteron,Etiocholanolon und DHT stimulierbar.

Charakteristisch für Hiluszelltumor und -hyperplasie scheint die stark ausgeprägte Stimulierbarkeit von Androstendion und Testosteron durch HCG zu sein.

Das Androluteoma gravidarum ist definiert als ein gutartiger, HCG-abhängiger Tumor des Ovars,der sich während der Schwangerschaft entwickelt.
In der Mehrzahl der Fälle ist dieser Tumor endokrin inaktiv, und wird nur zufällig während einer abdominellen Schnittentbindung entdeckt.
Manche dieser Tumoren sind jedoch endokrin aktiv, und führen zu Virilisierung von Mutter und Fetus.

Unter den 100 Fällen,die bis 1965 in der Litera-

tur beschrieben worden sind, zeigten 26 Virilisierungserscheinungen bei der Mutter.

Die excessive Virilisierung kann in unserem Fall eindeutig auf den um das 40-fache erhöhten Plasma-Testosteronwert zurückgeführt werden.
Androstendion war um das 10-fache der oberen Norm erhöht, stellte aber nicht das quantitativ vorherrschende Androgen dar.
Deutlich erhöht waren vor allem die sulfokonjugierten Steroide.
Nach Dexamethasongabe war keine Suppression der Androgenproduktion zu beobachten, nur Androstendion sank von 27,9 ng/ml auf die Hälfte des Ausgangswertes ab.
Die auf 24 mg/ Tag erhöhten 17-Ketosteroide im Urin sanken unter diesem Test nicht ab.

Solche Ausmaße von Androgenproduktion wurden bisher nur von OSBORN et al.(1969) bei einem ovariellen Lipidzelltumor einer nicht schwangeren Frau beschrieben. Androstendion übertraf bei diesem Tumor mit 64,4 ng/ml den Testosteronspiegel von 31,8 ng/ml. In diesem Falle kam der hohe Testosteronspiegel sekundär durch periphere Umwandlung des vermehrt produzierten Androstendions zustande, während der erhöhte Testosteronspiegel in unserem Fall durch primär erhöhte Produktion dieses Hormons durch den Tumor erklärt werden kann. Auch O`MALLEY et al.(1967) kamen bei ihren endokrinologischen Untersuchungen eines Luteoma gravidarum zu diesem Ergebnis wie wir. Diese These der direkt erhöhten Testosteronproduktion wird noch bestätigt durch die hohe

Testosteronkonzentration im Gewebe des Androluteoms wie von ZANDER et al.(1978) beschrieben.

Die Annahme O`MALLEY's, daß die Testosteronproduktion in dem von ihm untersuchten Luteom hauptsächlich über den 5-Weg, einschließlich der sulfokonjugierten Zwischenprodukte erfolgte, kann durch unsere Ergebnisse bestätigt werden, da Pregnenolon-Sulfat und DHEA-Sulfat in großen Mengen aus dem Tumorgewebe isoliert wurden. Das rasche Verschwinden des inkubierten Pregnenolons, und die Isolierung von Steroidsulfaten aus dem Tumor stimmen mit dem postulierten Syntheseweg überein.

Von den 26 beschriebenen virilisierenden Luteomen haben nur 12 sehr große Ähnlichkeit mit dem von uns beobachteten bezüglich klinischer und endokrinologischer Symptome:

Das Luteom tritt vorwiegend in der ersten oder zweiten Schwangerschaft auf.
In der Familien- und Eigenanamnese vor der Schwangerschaft ist keine vermehrte Androgenproduktion eruierbar.
Nur leicht erhöhte 17-Ketosteroid-Ausscheidung und Auftreten des Hirsutismus und Virilismus erst ab dem zweiten Drittel der Schwangerschaft sind ebenfalls Gemeinsamkeiten.

Von den neun weiblichen Säuglingen, die diesen Schwangerschaften entstammten, zeigten zwei Virilisierungssymptome.

Exp. No.	Name d.Pat.	Histolog. Diagnose	Aer.	Eti.	DHT	Testo.	Aen.	17-KS.	Test-Reakt.	Alter	Dauer
1	Sch.M.	Andro-blastom	11 x S: 2x	10 x S: 2x	Ø	6 x	4 x	9	HCG	Pubert.	2 J.
2	Ma.E.	Andro-blastom	Ø	Ø	Ø	10 x	2 x	11 D:6	HCG	Pubert. Fertil.	3 J.
3	Bi.F.	Famil. Hirsut.	10 x	20 x	20 x	2 x	1,5 x	11 D:5	Dexa	Pubert. Fertil.	14J.
4	Be.R.	Dermoid-cyste	3 x	60 x	Ø	3 x	Ø	9 D:4	Ø	Pubert. Fertil.	2 J.
5	Ma.ML.	Cyst. Adenofi.	25 x	Ø	Ø	1 x	2 x	9 D:5	Ø	Pubert. Fertil.	1 J.
6	Li.G.	Serös. Kystom	---	---	---	---	---	10,3 D:7	---	Pubert. Fertil.	17J.
7	De.F.	Hilus-tumor	8 x	30 x	25 x	8 x	7 x	8 D:12	HCG	Menop.	4 J
8	La.F.	Hilus-hyperp.	5 x S:1,2	50 x	7 x	2,5x	1,5 x	8 D:10	HCG	Menop.	5 J.
9	Ve.D.	Luteom	Ø S:2x	Ø	18 x	40 x	10 x	24 D:22	HCG	Fertil.	2 M.

Tabelle 9 : Zusammenfassung der Diskussion

Zeichenerläuterung :

Aer. = Androsteron
Eti. = Etiocholanolon
DHT = Dihydrotestosteron
Aen. = 4-Androstendion
Dauer = Dauer der Androgeneinwirkung
Ø = nicht gemessen, oder keine Erhöhung des Androgens
11 x = 11-fache Erhöhung des unkonjugierten Androgens
S: 11 x = 11-fache Erhöhung des sulfo-konjugierten Androgens
D:8 = Dexamethason-Reaktion der 17-KS

Exp. No.	Name d.Pat.	Histolog. Diagnose	Viril. Hirs.	Stimme	Klitoris	Zyklusstörung	Therapie	Seitenlokalis.	Tumorgröße	maligne	Besonderheiten
1	Sch.M.	Androblastom	V	+	+	sek.AM.	Exstirp.	links	6x4x4	-	Struma diff.
2	Ma.E.	Androblastom	V	+	+	OligoM. sek.AM.	Exst.re. Keilexc. li.	rechts	5x4x3	-	Struma diff.
3	Bi.F.	Famil. Hirsut.	H	-	-	OligoM.	Keilexc. re.u.li.	re.u.li.	normal	-	Nävus pilosus Verstärk.n.SS
4	Be.R.	Dermoidcyste	H	-	-	OligoM.	Exst.re. Keilexc. li.	rechts	5x6x5	-	li.Ovar vergr. mit Rindenfib.
5	Ma.ML.	Cyst. Adenofi.	H	-	-	OligoM.	Keilexc. re.u.li.	re.u.li.	Ovarien vergrößert	-	Hyperprolakt. Mikroadenom
6	Li.G.	Serös. Kystom	V	+	++	sek.AM	Exstirp.	links	mannsfaustgroß	-	Verstärk.inSS Cushing-Syndr.
7	De.F.	Hilustumor	V	+	+++	Postmenopause	abdom. Total-Op	links	4x4x3	-	
8	La.F.	Hilushyperp.	V	+	+++	Postmenopause	Adnekektomie	re.u.li.	4,5x2,5 6,5x2,5	-	Ut.myomatos. Diab.mell. Thymektomie
9	Ve.D.	Luteom	V	+	+++	---	Exstirp.	links	6x5x4	-	Beginn i.2. Drittel d.SS

Tabelle 10 : Zusammenfassung der Diskussion

Zeichenerläuterung :

V = Virilisierung
H = Hirsutismus
Stimme = Stimmvertiefung
Klitoris: + = leichte Vergrößerung
++ = mäßige Vergrößerung
+++ = erhebliche Vergrößerung
AM = Amenorrhoe

V. ZUSAMMENFASSUNG :

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit zeigt die Methode auf, mit der wir Plasma- und Urinproben zur Androgenbestimmung aufgearbeitet haben.
Die Androgene Androsteron, Etiocholanolon, DHT und Testosteron wurden gaschromatographisch bestimmt, Progesteron und Androstendion durch Radioimmunassay.

Der zweite Teil befaßt sich mit dem Krankengut von neun Patientinnen, die wegen Verdacht auf einen virilisierenden Ovarialtumor in unsere Klinik eingewiesen wurden.
In 4 Fällen handelt es sich um "echte" androgenproduzierende Tumoren: 2 Androblastome, 1 Hiluszelltumor, und 1 Androluteoma gravidarum.
In einem Falle handelt es sich um eine Hyperplasie der Hiluszellen des Ovars, in einem anderen stellten wir nach Ausschluß eines Stein-Leventhal-Syndromes bei normal großen Ovarien, jedoch erhöhten Testosteron- und Androstendionwerten die Diagnose eines "Familiären Hirsutismus".
In 3 weiteren Fällen diagnostizierten wir Ovarialtumoren, die im Allgemeinen nicht zu den androgenproduzierenden Ovarialtumoren gerechnet werden: Es handelt sich um eine Dermoidcyste, ein Cystadenofibrom und ein Seröses Cystom, die jedoch in unserem Fall ausgeprägte Symptome des Hirsutismus bzw. der Virilisierung hervorgerufen haben.

Die Diagnose eines androgenproduzierenden Prozesses sowie eine Aussage über dessen Lokalisation gelingen in den meisten Fällen durch den kombinierten Dexamethason-HCG-Test und die selektive Katheterisierung der Vv. ovaricae und Vv. suprarenales. Während dieser diagnostischen Maßnahmen genügt es, die beiden Androgene Testosteron und Androstendion im Plasma zu bestimmen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Androblastome vorwiegend in der Pubertät und im frühen Fertilitätsalter sich durch sekundäre Amenorrhoe bemerkbar machten. Sie führten innerhalb von zwei Jahren zu Virilisierung mit Klitorishypertrophie und Stimmvertiefung.
Die vermehrte Androgenproduktion fand vor allem in sulfokonjugierter Form statt, und war leicht durch HCG stimulierbar.

Bei unserer Patientin mit Familiärem Hirsutismus bestand der vermehrte Androgeneinfluß schon 14 Jahre lang. Trotzdem kam es zu keiner Virilisierung, keiner Klitorisvergrößerung und Stimmveränderung.
Da die endokrinologische Störung nur leichten Grades war, ließen sich die Androgene durch Dexamethason supprimieren. Die sulfokonjugierten Androgene und "freies" DHT ließen sich deutlich durch HCG stimulieren.

Dermoidcyste, Cystadenofibrom und Seröses Cystom zählen nicht zu den androgenproduzierenden Ovarialtumoren.
Sie führten in unseren Untersuchungen bei mäßig erhöhten Testosteron- und Androstendionwerten nicht zu Virilisierung, Klitorishypertrophie und Stimmvertiefung, außer beim Serösen Cystom, bei dem die Androgeneinwirkung 17 Jahre lang bestand.
Diese Tumoren traten in der Pubertät und im frühen Fertilitätsalter auf.
Bei der Dermoidcyste zeigte Testosteron keine Stimulierbarkeit durch HCG, und nur geringe Supprimierbarkeit durch Dexamethason.
Das Cystadenofibrom ist der einzige von uns beschriebene Tumor, der quantitativ mehr Androstendion als Testosteron produzierte. In unserem Fall trat dieser Tumor im Jugendalter auf, gewöhnlich findet man ihn im Klimakterium.
Beachtung verdient bei dieser Patientin der Nebenbefund eines Hypophysenmikroadenoms mit Hyperprolaktinämie.

Virilisierende Seröse Cystome sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Hiluszelltumor und Hiluszellhyperplasie traten in der Postmenopause auf, und führten langsam (4-5 Jahre) zu ausgeprägten Virilisierungssymptomen.
Testosteron war das im Plasma überwiegend erhöhte androgene Hormon. Auffallend waren die hohen Werte von Androsteron, Etiocholanolon und Dihydrotestosteron.
Ausgeprägte HCG-Stimulierbarkeit wurde bei Androsteron-Sulfat, Testosteron und Androstendion festgestellt.

Beim Androluteoma gravidarum handelte es sich um einen HCG-abhängigen Ovarialtumor, der im zweiten Drittel einer Schwangerschaft auftrat, und innerhalb kürzester Zeit zu ausgeprägten Virilisierungserscheinungen mit entstellender Akne, Stimmbruch und Klitorishypertrophie führte. Plasma-Testosteron war um das 40-fache, Androstendion um das 10-fache der Norm erhöht. Die Androgene wurden vorwiegend in sulfokonjugierter Form produziert.

In allen Fällen bildeten sich postoperativ die Symptome des Hirsutismus und der Virilisierung bis auf geringe Reste zurück.

Obwohl im allgemeinen die Malignität der androgenproduzierenden Tumoren des Ovars mit 20-25 % angegeben wird, konnten wir bei keinem der untersuchten Tumoren Malignitätszeichen feststellen.

Unsere Untersuchungen und Ergebnisse bestätigen, daß es nicht möglich ist, vom inkretorischen auf den histologischen Charakter eines Tumors zu schließen. Wir müssen außerdem feststellen, daß sich keiner der beschriebenen Tumoren durch ein bestimmtes Androgen charakterisieren läßt.
Hirsutismus und Virilisierung wurden nicht durch ein bestimmtes Androgen hervorgerufen, sondern wurden vom Ausmaß der Produktion von Testosteron und Androstendion und der Dauer ihrer Einwirkung auf den weiblichen Organismus bestimmt.

VI. Literatur-Verzeichnis :

1. ABRAHAM,G.E.:
Ovarial and adrenal contributions to peripheral androgens in hirsute women.
Obstet.Gynecol. 46, 169-173,1975

2. ABRAHAM,G.E.:
Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle.
J.Clin.Endocrinol.Metab.39,340,1974

3. De ALVARIZ,R.R. et al.:
Virilizing lipoid tumors of the ovary.
Obstet.Gynecol. 35, 956,1970

4. BAIRD,D.T.; HORTON,R.:
Steroid dynamics under steady conditions.
Recent Prog.Horm.Res.25, 611, 1969

5. BARDIN,C.W; LIPSETT,M.B.:
Testosterone and androsterone blood production rates in normal women and in women with idiopathic hirsutism or polycystic ovaries.
J.Clin.Invest. 46, 891, 1967

6. BERGER,M.L.:
Sur l'existence des glandes sympathicotropes dans l'ovaire et le testicule humaines. Leurs rapports avec la glande interstitielle du testicule.
C.R.Acad.Sci. Paris 175, 907, 1922

7. BERGER,M.L.:
Tumour des cellules sympathicotropes de l'ovaire avec virilisation.
Rev.Canad.Biol. 1, 539, 1942

8. BRUCHOVSKY,N.; WILSON,J.D.:
J.Biol.Chem. 243, 2012, 1968

9. CALVIN,H.I. et al.:
Column liquid-liquid-partition chromatography of steroidal sulfates.
Analyt.Biochem.15, 426,1966

10. CHAMBERLAIN,J. et al.:
Analysis of steroid metabolites by gas chromatography.
J.Endocrin. 26, 367,1963

11. CRÈPY,O.; RULLEAU-MESLIN,F.:
Quantitative and qualitative determination of steroid sulfates with the aid of methylenblue.
Rev.Franc.Etudes Clin.Biol.5,283, 1960

12. CZYGAN,P.J.:
Endokrine Regulation im Klimakterium.
Archiv f.Gynäkologie,Band 224, S.382

13. DEMISCH,K. et al.:
Untersuchungen über das Verhalten der Androgene im Plasma hirsuter Frauen.
Deutsche Medizin.Wochenzeitschr.20,1117,1975

14. DORFMAN,R.J.; UNGAR,F.:
Metabolism of steroid hormones.
Academic Press,N.Y.,London,1965

15. EIK-NES,K.B.; HORNING,E.C.:
Gasphase chromatography of steroids.
Monogr.Endocrin.Vol.2, 1968

16. FARBER,M. et al.:
Diagnostic evaluation of hirsutism in women.
Clin.Obstet.Gynec.Vol.20,Nr.1,March 1977

17. FAUCETTE,W.E.; CAWLEY,L.P.:
Effective adsorption of DHEA-sulfate and other 17-Ketosteroid-conjugates from urine by Amberlite.
Clin.Biochem. 4, 287, 1971

18. FRASIER,S.D.; HORTON,R.:
Androgens in the peripheral plasma of prepuberal children and adults.
Steroids 8, 777, 1966

19. GOLD, J.J.:
Gynecologic endocrinology.
Edit.2,1975,Harper and Row, Hagerstown

20. GOLDZIEHER,J.W. et al.:
The quantitative extraction and partial purification of steroids in tissue and blood.
Steroids 21, 61-71, 1961

21. GREENBLATT,R.B.:
The hirsute female.
Charles C.Thomas,Springfield,Illinois,1963

22. GREENBLATT,R.B.; MAHESH,V.B.:
Arrhenoblastoma:Three case reports.
Obstet.Gynecol.39 567,1972

23. GYÖRGY,G. et al.:
Concentration of unconjugated adrenic hormones and their precursors in normal and polycystic ovaries.
Endokrinologie,Bd.64,Heft 2, 181, 1975

24. HENI; KLAUS in SCHWALM-DÖDERLEIN :
Klinik der Frauenheilk. u. Geburtshilfe.
Urban u.Schwarzenberg, Bd. VII

25. HORTON,R.; TAIT,J.F.:
Androstendione production and interconversion rates messured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosteron.
J.Clin.Invest. 45,301,1966

26. ITO,; HORTON,R.:
Dihydrotestosterone in human peripheral plasma.
J.Clin.Endocrinol.Metab.31,362, 1970

27. JÄNNE,O. et al.:
Plasma Pregnenolone,Progesterone, 17-OH-Progesterone,Testosterone and 5 -Dihydro-testosterone in different types of congenital adrenal hyperplasia.
Clin.Endocrin. 4 , 39-48,1975

28. JANOVSKI, et al.:
Ovarian tumors.
Thieme-Verlag,Stuttgart,1973

29. De JONG,F.H.; BAIRD,DT.; VAN DER MOLEN,H.J.:
Ovarian secretion rates of Progesterone, Oestrogens and Androgens in normal women and in women with persistant ovarian follicles.
Acta Endocrin.77,575-587, 1974

30. KASE,N.; CONRAD,S.H.:
Steroid synthesis in abnormal ovaries.
Am.J.Obstet.Gynecol. 90, 1251, 1964

31. KIRSCHNER,M.A.; TAYLOR,J.P.:
New derivates for electron capture-gas chromatography of steroids.
Analyt. Biochem.30, 316, 1969

32. KIRSCHNER,M.A.; BARDIN,C.W.:
Androgen production and metabolism in normal and virilized women.
Metabolism. 21, 667, 1972

33. KIRSCHNER,M.A. et al.:
Idiopathic hirsutism - An ovarian abnormality.
N.Engl.J.Med. 294, 637, 1976

34. LIPSETT,M.B.; KIRSCHNER,M.A.:
Malignant lipid cell tumor of the ovary: Clin., biochem. and etiologic considerations.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 30, 336, 1970

35. LABHART,A.:
Klinik der inneren Sekretion.
Springer-Verlag,Berlin, 2.Auflage,1971

36. LAATIKAINEN,T.; PELKONEN,R.; VIHKO,R.:
Plasma steroids in two subjects with ovarian androgenproducing tumors, arrhenoblastoma and gynandroblastoma.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 34, 580, 1972

37. MACK,H.C.:
The ovary.
Ch.C.Thomas (Publ.),Springfield,USA, 1968

38. MAHESH,V.B. et al.:
Endocrine studies in the arrhenoblastoma.
Am.J.Obstet.Gynecol. 107, 183, 1970

39. MICKAN,H.; DIXON,R.; HOCHBERG,R.B.:
Partition column chromatography of steroid triethylammonium sulfates.
Steroids 13, 477-483, 1969

40. MICKAN,H. :
Vergleichende Untersuchungen über den Stoffwechsel von 4-^{14}C-Progesteron in der fetalen Haut und in der Haut des Erwachsenen.
Acta Endocrin. 70, 175- 184, 1972

41. VAN DER MOLEN,H.J.:
Electron capture detection of steroids isolated from biological samples.
Ann.Clin.Res.2 279, 1970

42. MORI,T. et al.:
Clinical and biochemical studies of a patient with a hilus cell tumor.
J.Endocrinol. 47, 13, 1970

43. MORRIS,J.; SCULLY,R.:
Endocrine pathology of the ovary.
St.LOUIS C.V.Mosby, 1958

44. MORROW,L.B.; THOMPSON,R.J.:
Ovarian lipoid cell tumor :
Urinary response to adrenocortocotropin and chorionic gonadotropin.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28, 1756, 1968

45. MEYER,R.:
Amer.J.Obstet.Gynecol.22, 697, 1931

46. NIKOLAS,A.; JANOVSKI, :
Ovarian tumors.
Thieme-Verlag,Stuttgart, 1973

47. OSBORN,R.H. et al.:
Plasma androgens in the normal and androgenic female. A review.
Obstet.Gynecol.Surv. 26, 195, 1971

48. OSBORN,R.H. et al.:
Androgen studies in a patient with lipoid cell tumor of the ovary.
Obstet.Gynecol. 33, 666, 1966

49. O'MALLEY,B.W.;LIPSETT,M.B.;JACKSON,M.A.:
Steroid content and synthesis in a virilizing luteoma.
J.Clin.Endocrinol.Metab.27, 311, 1967

50. PAL,S.B.:
Urinary steroid excretion in hirsutism.
Steroids Lipids Res. 3, 14-23, 1972

51. PARKER,CH.R. et al.:
In vivo endocrine studies in adrenal rest tumor of ovary.
Obstet.Gynecol.Vo.44, No.3,327-332, 1974

52. RIPPMANN,E.T. et al.:
Der Hiluszelltumor des Ovars.
Gynaecologia (Basel) 166, 424, 1968

53. ROSENFIELD,R.L.:
Plasma testosterone binding globuline and indexes of the concentration of unbound plasma androgens in normal and hirsute subjects.
J.Endocrinol.Metab. 32, 717, 1971

54. RYAN,K.J.; PETRO,Z.:
Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and theca cells.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 26, 46, 1966

55. SCHINDLER,A.E.:
Steroide im Fruchtwasser.
Fortschr. d. Gebuetsh. u. Gynäkol. 46, 1,1972

56. SCHWALM - DÖDERLEIN:
Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe.
Bd.VII,VIII, Urban u.Schwarzenberg,1977

57. SCULLY,R.E.:
Androgenic lesions of the ovary.
in : The ovary
Internat.Acad. of Pathology Monograph
pp.143-174, ed.by Grady,H.G.; Smith,D.E.
Baltimore,Williams and Wilkins Co. 1963

58. SCULLY,R.E.:
Sex cord-mesenchym tumors.Pathologic classification and its relation to prognosis and treatment.
in: Ovarian cancer.
UICC Monograph Series, ed. by Gentil.F.
Vol.11, pp.40-57,Berlin,Springer-Verlag,1968

59. SENTIALL,I.R.:
Acid steroid metabolites.
Biochemical Medicine 8, 423, 1973

60. SETCHELL,K.D.R.; SHACKLETON,C.H.L.:
The group separation of plasma and urinary steroids by column chromatography on Sephadex LH-20.
Clin.Chem.Acta 47, 381, 1973

61. SIITERI,P.K.:
The isolation of steroid conjugates.
in: Chemical and biological aspects of steroid conjugation.
Eds.: Bernstein,S.;Solomon,S.;
Springer-Verlag,Berlin, 1970

62. SJÖVALL,J.; SJÖVALL,K.; VIHKO,R.:
Steroids 11, 703,1968

63. SMITH,O.W.; RYAN,K.J.:
Estrogen in the human ovary.
Am.J.Obstet.Gynecol. 84, 141, 1962

64. STERNBERG,W.H.:
The morphology,androgenic funktion, hyperplasia and tumors of the human ovarian hilus cells.
Amer.J.Path. 25, 493, 1949

65. STERNBERG,W.H.:
Influence of chorionic gonadotropins on human ovarian hilus cells.
J.Clin.Endocrinol.13, 139, 1953

66. THOMAS,J.P. et al.:
Androgen metabolism in the skin of hirsute women.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 38, 19, 1974

67. De VANE,G.W. et al.:
Circulating gonadotropins, estrogens and androgens in polycystic ovarian disease.
Am.J.Obstet.Gynecol.121,496-500, 1975

68. VERMEULEN,A.L. et al.:
Capacity of the testosteron-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate.
J.Clin.Endocrinol.Metab.29, 1470, 1968

69. VIHKO,R.:
Gas chromatographic-mass spectrometric studies on solvolyzable steroids in human peripheral plasma.
Acta Endocrinologica Suppl. 109, 1966

70. VÖLPEL,M.:
Hiluszellwucherungen im Ovar bei kongenitalem adrenogenitalem Syndrom.
Virchows Arch.Abt.Path.Anat.352, 43, 1971

71. WARREN,J.C.:
Hilus-cell adenoma in a dysgenetic gonad with XX / XO - mocaicism.
Lancet 1, 141, 1964

72. WIEST,W.G.; ZANDER,J.; HOLMSTROM,E.G.:
Metabolism of progesteron-4-C 14 by an arrhenoblastoma.
J.Clin.Endocrinol.Metab.19, 1959

73. ZANDER,J.:
17α-Oxy-Progesteron und Δ4-Androsten-3,17-dion im menschlichen Ovarium.
Klin. Wochenschrift 35, 1101, 1957

74. ZANDER,J.:
Steroids in the human ovary.
J.Biol.Chem. 232, 117-121,1958

75. ZANDER,J.; MICKAN,H.; HOLZMANN,K.; LOHE,K.J.:
Androluteoma syndrome of pregnancy.
Am.J.Obstet.Gynecol. 130, 170, 1978

76. ZIMMERMANN,W.:
Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung.
Z.Physiol.Chem. 233, 257, 1935

77. ZUCKERMANN,S.:
The ovary.
Ed. 2, Vol. 1-3, London Academic Press, 1977

Lebenslauf

Ich, Anton Hofer, wurde am 6.April 1951 in Gremheim, Krs.Dillingen/Do. als fünftes Kind der Landwirtseheleute Georg und Maria Hofer (geb.Siebinger) geboren.

1957	Volksschule in Gremheim
1962	Humanistisches Gymnasium in St.Ottilien/Obb.
1971	Abitur in St.Ottilien
1971	Beginn des Studiums d.Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1972	Wissenschaftliche Vorprüfung
1974	Ärztliche Vorprüfung
1975	1.Teil der Ärztlichen Prüfung
1977	2.Teil der Ärztlichen Prüfung
1977	Prakt.Jahr in der I.Chirurg.Klinik in Augsburg,der I.Univ.Frauenklinik in München und dem Städt.Krankenhaus München Schwabing.
1978	3.Teil der Ärztlichen Prüfung Mündliches Staatsexamen
1978	Approbation
1978	Musterungsarzt beim Kreiswehrersatzamt in Donauwörth